

Rec'd PCT/PIO 23 MAY 2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

PCT/JP 03/15223

28.11.03

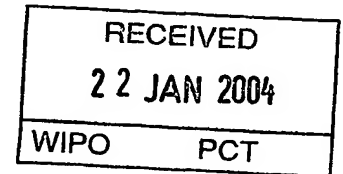
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 2 年 1 1 月 2 8 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 2 - 3 4 6 4 4 7
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 2 - 3 4 6 4 4 7]

出 願 人
Applicant(s): エーザイ株式会社



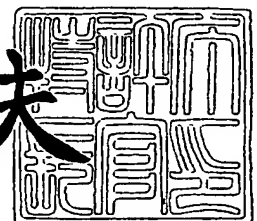
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 月 7 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 1 0 8 9 9 6

【書類名】 特許願

【整理番号】 E1-A0207

【提出日】 平成14年11月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市下京区西七条石井町 3 3 丁目 1 7 番地 シ
 ャロム 3 3 2 0 2 号室

 【氏名】 竹内 勝一

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市西京区下津林東芝ノ宮町 グランディール
 K E I 3 0 3 号室

 【氏名】 佐藤 啓子

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市右京西京極佃田町 1 3 丁目 ラセツトアベ
 ニユー 7 0 7 号室

 【氏名】 坂本 佳正

【発明者】

 【住所又は居所】 大阪府茨木市大池 1 丁目 1 4 番地 2 2 号 チサトマンシ
 ョン 3 0 2 号室

 【氏名】 俵田 真紀

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市右京区太秦開日町 2 1 丁目 3 番地 ウイン
 ベルコーラス太秦 1 0 9

 【氏名】 大塚 稔久

【特許出願人】

 【識別番号】 000000217

 【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 哺乳動物 Prickle 遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 哺乳動物 Prickle 蛋白質をコードする (1)～(4) の核酸配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド。

(1) 配列番号:1 のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(2) 配列番号:2 の核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(3) 配列番号:1 のアミノ酸配列において 1 若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列

(4) 上記 (2) の配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列

【請求項 2】 請求項 1 記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 3】 請求項 1 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 2 記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 4】 請求項 1 記載のポリヌクレオチドを翻訳する工程を含む、該ポリヌクレオチドによりコードされる哺乳動物 Prickle 蛋白質を製造する方法。

【請求項 5】 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの断片であり、少なくとも 8 アミノ酸残基を有するポリペプチド断片。

【請求項 6】 請求項 1 記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または請求項 5 記載のポリペプチド断片に対する抗体。

【請求項 7】 請求項 5 記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、シナプス後膜肥厚 (postsynaptic density; PSD) に発現している哺乳動物 Prickle (mammalian prickle; mPrickle) 蛋白質をコードする新規遺伝子に

関する。さらに、本発明は該遺伝子を用いたポリペプチドの製造方法、該ポリペプチドの断片、並びに該ポリペプチドに対する抗体に関する。

【0002】

【従来の技術】

神経シナプスとは非対称形の神経細胞間の接着部位を指す。神経シナプスは神経伝達の中心でもあり、神経活動に依存してその接着を活発に変化させ、シナプス前膜及び後膜における神経伝達の効率を調節している。シナプス後膜肥厚(PSD)は、細胞骨格蛋白質が興奮性シナプスのシナプス後膜を裏打ちする特殊化した領域であり、PSD-95等の骨格分子(scaffolding molecule)、神経伝達物質受容体、イオンチャンネルが数多く存在し、神経細胞の形態変化、神経可塑性等の神経系の機能に深く関与していると考えられている(Y.Yoshimura and T. Yamauchi (1997) J. Biol. Chem. 272: 26354; S. Stack et al. (1997) J. Biol. Chem. 272: 13467; Siekevitz et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3494-8; Walch and Kuruc (1992) J. Neurochem. 59: 667-8)。特に、膜蛋白質のニューロン内での局在及びクラスター化は、ニューロンの発達及びシナプス形成にとって重要である。従って、このような膜蛋白質と相互作用する蛋白質は、膜蛋白質の細胞における空間的配置、シナプスの活性制御、神経伝達物質受容体機能の調節等に影響することが考えられる。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

Prickleはショウジョウバエ(*Drosophila*)のplanar cell polarityに關与する蛋白質であり、羽に生える毛の向きを制御していることが知られている(以下、ショウジョウバエのPrickle蛋白質をD-Prickleと呼ぶ)(Gubb et al. (1999) "The balance between isoforms of the prickle LIM domain protein is critical for planar polarity in *Drosophila* imaginal discs.", *Genes Dev.* 13: 2315-27)。D-Prickleはdishevelled(Dsh)と結合し、Dshの局在を変化させることでfizzled(fz)からのシグナル伝達を阻害すると考えられている。また、JNK(c-Jun N-terminal kinase)のシグナリングは、planar cell polarityのシグナリングと関連しているが、哺乳動物のDshもショウジョウバエの場合と同様にJNKシグ

ナリングを活性化させる。これらの事実から、哺乳動物でもDshとPrickle蛋白質が相互作用することで、シナプスの極性形成やJNKシグナリングに関与している可能性がある。しかしながら、このショウジョウバエのPrickle(以下、D-Prickleと言う)に対応する、高等動物におけるホモログは単離されていない。そこで、本発明の目的は、ショウジョウバエのPrickleの高等動物におけるホモログを同定し、提供することである。

【0004】

【課題を解決するための手段】

MS733は、本発明者らによりラット大脳からPSD分画に濃縮している蛋白質として同定された。本発明において、その一次構造を決定し、機能解析を行った。その結果、MS733は847アミノ酸からなるN末端に3つのLIMドメインを有し、1つのPESドメインを有する蛋白質であることが判明した。さらにデータベースサーチの結果から、ショウジョウバエ(*Drosophila*)のprickle蛋白質と高い相同性を示すことが判明した。そこで、本発明のMS733蛋白質を哺乳動物(mammalian) prickle(mPrickle)と命名した。以下、特に配列番号:1記載のアミノ酸配列を有するラット由来の蛋白質をR-Prickleと呼ぶ。本発明において作成したmPrickleに対する抗体を用いた解析により、mPrickleが生化学的にPSD分画に濃縮し、細胞骨格に強く結合していることが明らかとなった。さらに、ラット海馬初代神経細胞を用いた解析からは、mPrickleの局在が、シナプトフィジン、PSD-95、GAD等と一致した。これらの結果から、mPrickleは新規のシナプス蛋白質であることが判明した。

【0005】

さらに研究を進めたところ、mPrickleに対する抗体を用いて生体内のmPrickleを沈澱させると神経伝達物質であるNMDA受容体と一緒に沈澱することがわかった。NMDA受容体は、学習及び記憶に関与しており、精神疾患等において重要な役割を果たしていることが知られている(J.Z.Tsien (1999) "Genetic enhancement of learning and memory in mice.", *Nature* 401: 63-9)。また、mPrickleはPSD蛋白質であるPSD-95と結合することが、本発明者らにより明らかにされた。PSD-95は、シナプスの成熟、学習、及び記憶の細胞レベルにおけるモデルとして考え

られている長期増強(long term potentiation; LTP)の発現において重要な役割を果たしていることが明らかにされている(El-Husseini et al. (2000) "PSD-95 involvement in maturation of excitatory synapses.", Science 290: 1364-8; Migaud et al. (1998) "Enhanced long-term potentiation and impaired learning in mice with mutant postsynaptic density-95 protein", Nature 396: 433-9)。従って、本発明のmPrickleをのドラッグデリバリーの標的とすることにより、記憶と密接に関与するPSD-95及びNMDAレセプター等を間接的なターゲットとすることができると考えられる。

【0006】

より具体的には、本発明は

- [1] 哺乳動物Prickle蛋白質をコードする(1)～(4)の核酸配列から選択される配列を含むポリヌクレオチド、
 - (1)配列番号:1のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (2)配列番号:2の核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (3)配列番号:1のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換、または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列
 - (4)上記(2)の配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列
- [2] [1]記載のポリヌクレオチドを含むベクター、
- [3] [1]記載のポリヌクレオチドまたは[2]記載のベクターを含む宿主細胞、
- [4] [1]記載のポリヌクレオチドを翻訳する工程を含む、該ポリヌクレオチドによりコードされる哺乳動物Prickle蛋白質を製造する方法、
- [5] [1]記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの断片であり、少なくとも8アミノ酸残基を有するポリペプチド断片、
- [6] [1]記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、または[5]記載のポリペプチド断片に対する抗体、並びに
- [7] [5]記載のポリペプチド断片をコードするヌクレオチド鎖、

に関する。

【0007】

【発明の実施の形態】

＜ポリヌクレオチド＞

本発明のポリヌクレオチドは、mPrickle蛋白質を遺伝子工学的に発現させる際に使用することができる。mPrickle蛋白質は、本発明においてシナプスに局在することが確認され、シナプスのマーカーとして使用することができる。即ち、本発明のmPrickle蛋白質をコードするポリヌクレオチド、またはその一部の特異的断片を使用して、mPrickle遺伝子の発現を検出することによりシナプスを検出することができる。従って、本発明のポリヌクレオチドは、シナプス検出試薬として用いることもできる。また、骨格蛋白質として知られるPSD-95と結合することが示され、PSD-95の精製に利用することもできる。さらに、mPrickleに対する抗体を用いてmPrickleを生体内より沈澱させるとNMDA受容体も一緒に沈澱されることから、NMDA受容体を標的としたドラッグデリバリーシステムにおいてmPrickleを利用することができる。NMDA受容体は、学習及び記憶と密接に関連し、精神疾患との関係も指摘されていることから、将来的には、mPrickleを利用したボケ、痴呆等の学習・記憶に関連した疾患の診断も可能と考えられる。本発明のポリヌクレオチドは、mPrickleをコードする、配列番号:2の核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含むものである。

【0008】

ここで、「ポリヌクレオチド」とは、複数のデオキシリボ核酸(DNA)またはリボ核酸(RNA)等の塩基または塩基対からなる重合体を指し、DNA、cDNA、ゲノムDNA、化学合成DNA及びRNAを含む。また、天然以外の塩基、例えば、4-アセチルシチジン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウリジン、2'-O-メチルシチジン、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウリジン、ジヒドロウリジン、2'-O-メチルプソイドウリジン、 β -D-ガラクトシルキユエオシン、2'-O-メチルグアノシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデノシン、1-メチルアデノシン、1-メチルプソイドウリジン、1-メチルグアノシン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアノシン、2-メチルアデノシン、2-

メチルグアノシン、3-メチルシチジン、5-メチルシチジン、N6-メチルアデノシン、7-メチルグアノシン、5-メチルアミノメチルウリジン、5-メトキシアミノメチル-2-チオウリジン、 β -D-マンノシルキユエオシン、5-メトキシカルボニルメチル-2-チオウリジン、5-メトキシカルボニルメチルウリジン、5-メトキシウリジン、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデノシン、N-((9- β -D-リボフラノシル-2-メチルリオプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)N-メチルカルバモイル)トレオニン、ウリジン-5-オキシ酢酸-メチルエステル、ウリジン-5オキシ酢酸、ワイブトキソシン、プソイドウリジン、キユエオシン、2-チオシチジン、5-メチル-2-チオウリジン、2-チオウリジン、4-チオウリジン、5-メチルウリジン、N-((9- β -D-リボフラノシルプリン-6-イル)カルバモイル)トレオニン、2'-O-メチル-5-メチルウリジン、2'-O-メチルウリジン、ワイブトシン、3-(3-アミノ-3-カルボキシプロピル)ウリジン等を必要に応じて含むポリヌクレオチドも包含する。

【0009】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、mPrickle蛋白質をコードする、配列番号:1記載のアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。このようなアミノ酸配列をコードする核酸配列は、配列番号:2に記載された核酸配列に加えて、遺伝子暗号の縮重により配列番号:2記載の配列とは異なる核酸配列を含むものである。本発明のポリヌクレオチドを遺伝子工学的な手法によりポリペプチドを発現させるのに用いる場合、使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、発現効率の高いヌクレオチド配列を選択し、設計することができる(Grantham et al. (1981) Nucleic Acids Res. 9: r43-74)。

【0010】

本発明のポリヌクレオチドは、mPrickle蛋白質、またはその抗原性断片をコードする、配列番号:1のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードする核酸配列、または該核酸配列に相補的な配列を含む。1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列からなる変異ポリペプチドで、元のポリペプチドと同じ生物学的活性が維持されることは公知である(Mark et al. (1984) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 81: 5662-6; Zoller and Smith (1982) Nucleic Acids Res. 10: 6487-500; Wang et al. (1984) Science 224: 1431-3; Dalbadie-McFarland et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6409-13)。

【 0 0 1 1 】

ここで、アミノ酸の置換とは、配列中のアミノ酸残基の一つ以上が、異なる種類のアミノ酸残基に変えられた変異を意味する。このような置換により本発明のポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸配列を改変する場合、蛋白質の機能を保持することが必要な場合には、保存的な置換を行うことが好ましい。保存的な置換とは、置換前のアミノ酸と似た性質のアミノ酸をコードするように配列を変化させることである。アミノ酸の性質は、例えば、非極性アミノ酸(Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val)、非荷電性アミノ酸(Asn, Cys, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr)、酸性アミノ酸(Asp, Glu)、塩基性アミノ酸(Arg, His, Lys)、中性アミノ酸(Ala, Asn, Cys, Gln, Gly, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val)、脂肪族アミノ酸(Ala, Gly)、分枝アミノ酸(Ile, Leu, Val)、ヒドロキシアミノ酸(Ser, Thr)、アミド型アミノ酸(Gln, Asn)、含硫アミノ酸(Cys, Met)、芳香族アミノ酸(His, Phe, Trp, Tyr)、複素環式アミノ酸(His, Trp)、イミノ酸(Pro, 4Hyp)等に分類することができる。中でも、Ala、Val、Leu及びIleの間、Ser及びThrの間、Asp及びGluの間、Asn及びGlnの間、Lys及びArgの間、Phe及びTyrの間の置換は、蛋白質の性質を保持する置換として好ましい。変異されるアミノ酸の数及び部位は特に制限されず、該ポリヌクレオチドによりコードされるアミノ酸がmPrickle蛋白質の抗原性を有していれば良い。

【 0 0 1 2 】

このような配列番号:1のアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換または付加されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection 8.1-8.5)、Hashimoto-Goto et al. (1995) Gene 152: 271-5、Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz (1987) Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel (1988) Method. En

zymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

【0013】

さらに、本発明のポリヌクレオチドは、mPrickle蛋白質、またはその抗原性断片をコードする、配列番号: 2の核酸配列または該核酸配列に相補的な配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸配列、を含むポリヌクレオチドである。このようなポリヌクレオチドとしては、アイソフォーム、アルタナティブアイソフォーム、及びアレリック変異体が考えられ、本発明のポリヌクレオチドに含まれる。このようなポリヌクレオチドは、配列番号: 2を含む核酸配列からなるポリヌクレオチド、またはその断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション、サザンプロット等の公知のハイブリダイゼーション法により、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。cDNAライブラリーの作成方法については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989))を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【0014】

より具体的に、cDNAライブラリーの作製においては、まず、本発明のポリヌクレオチドを発現する細胞、臓器、組織等からグアニジン超遠心法(Chirwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-9)、AGPC法(Chomczynski and Sacchi (1987) Anal. Biochem. 162: 156-9)等の公知の手法により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit(Pharmacia)等を用いてmRNAを精製する。QuickPrep mRNA Purification Kit(Pharmacia)のような、直接mRNAを調製するためのキットを利用してもよい。次に得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit(生化学工業)のようなcDNA合成のためのキットも市販されている。その他の方法として、cDNAはPCRを利用した5'-RACE法(Frohman et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8998-9002; Belyavsky et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2919-32)により合成、及

び増幅させてもよい。また、全長率の高いcDNAライブラリーを作製するために、オリゴキャップ法(Maruyama and Sugano (1994) Gene 138: 171-4; Suzuki (1997) Gene 200: 149-56)等の公知の手法を採用することもできる。上述のようにして得られたcDNAは、適当なベクター中に組み込む。

【0015】

本発明におけるハイブリダイゼーション条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、50℃」、「2×SSC、0.1%SDS、42℃」、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件としては、例えば「2×SSC、0.1%SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」、「0.2×SSC、0.1%SDS、65℃」等の条件を挙げることができる。より詳細には、Rapid-hyb buffer(Amersham Life Science)を用いた方法として、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、プローブを添加して1時間以上68℃に保ってハイブリッド形成させ、その後、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、最後に、1×SSC、0.1%SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行うことも考えられる。その他、例えばExpresshyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、55℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行い、標識プローブを添加し、37～55℃で1時間以上インキュベートし、2×SSC、0.1%SDS中、室温で20分の洗浄を3回、1×SSC、0.1%SDS中、37℃で20分の洗浄を1回行うこともできる。ここで、例えば、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションや2度目の洗浄の際の温度を上げることにより、よりストリンジェントな条件とすることができる。例えば、プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの温度を60℃、さらにストリンジェントな条件としては68℃とすることができる。当業者であれば、このようなバッファの塩濃度、温度等の条件に加えて、その他のプローブ濃度、プローブの長さ、反応時間等の諸条件を加味し、本発明の実施例において得られたラットPrickleのアイソフォーム、アレリック変異体、及び対応する他種生物由来の遺伝子を得るための条件を設定することができる。

【0016】

ハイブリダイゼーション法の詳細な手順については、『Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.』(Cold Spring Harbor Press (1989);特にSection

9.47-9.58)、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987-1997);特にSection6.3-6.4)、『DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach 2nd ed.』(Oxford University (1995);条件については特にSection2.10)等を参照することができる。ハイブリダイズするポリヌクレオチドとしては、配列番号: 2を含む核酸配列に対して少なくとも50%以上、好ましくは70%、さらに好ましくは80%、より一層好ましくは90%(例えば、95%以上、さらには99%)の同一性を有する核酸配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。このような同一性は、BLASTアルゴリズム(Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2264-8; Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいたプログラムとして、アミノ酸配列についての同一性を決定するプログラムとしてはBLASTX、ヌクレオチド配列についてはBLASTN(Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-10)等が開発されており、本発明の配列に対して使用することができる。具体的な解析方法については、例えば、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>等を参照することができる。本発明の哺乳動物Prickle遺伝子がコードする蛋白質とD-Prickleのアミノ酸レベルでの相同性は、約23%であった。

【0017】

その他、遺伝子増幅技術(PCR)(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 6.1-6.4)により、mPrickleのアイソフォームやアレリック変異体等、mPrickleと類似した構造及び機能を有する遺伝子を、配列番号: 2に記載の核酸配列を基にプライマーを設計し、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ニワトリ、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の動物のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることができる。

【0018】

本発明のポリヌクレオチドの塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができる。例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法(Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463)等により行うことができる。また、適当なDNAシーケンサーを利用して配列を解析することも可能である。

【0 0 1 9】

<ヌクレオチド鎖>

さらに、本発明により、本発明のポリヌクレオチドに相補的な、少なくとも15塩基からなるヌクレオチド鎖が提供される。ここで「相補的な配列」とは、ヌクレオチド配列中の少なくとも15個の連続した塩基が鋳型に対して完全に対になっている場合のみならず、そのうちの少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上(例えば、97%または99%)が対になっているものも含む。対になっているとは、鋳型となるポリヌクレオチドの塩基配列中のAに対しT(RNAの場合はU)、TまたはUに対しA、Cに対しG、そしてGに対対しCが対応して鎖が形成されていることを意味する。そして相同性は、上述のハイブリダイズするポリヌクレオチドの場合と同様の方法で決定することができる。

【0 0 2 0】

このような本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドを検出または単離するためのプローブ、増幅するためのプライマーとして利用することができる。通常、プライマーとして使用する場合には15~100、好ましくは15~35個の塩基より構成されていることが望ましく、プライマーとして使用する場合には、少なくとも15、好ましくは30個の塩基より構成されていることが望ましい。プライマーの場合には、3' 末端側の領域を標的とする配列に対して相補的な配列に、5' 末端側には制限酵素認識配列、タグ等を付加した形態に設計することができる。本発明のヌクレオチド鎖は、本発明のポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることができる。さらに、これらのプローブまたはプライマーを用いて、細胞内における本発明のポリヌクレオチドの変異を検出することができる。このような変異は、場合により本発明のポリペプチドの活性、または発現の異常を引き起こすものであることから、疾病の診断等に有用と考えられる。

【0 0 2 1】

また、本発明のヌクレオチド鎖には、本発明のポリヌクレオチドの細胞内における発現をmRNAまたはDNAに対して結合することにより抑制するアンチセンス核酸、及び、mRNAを特異的に開裂することにより阻止するリボザイムが含まれる。

【0 0 2 2】

アンチセンスが標的遺伝子の発現抑制作用の機構としては、(1)3重鎖形成による転写開始阻害、(2)RNAポリメラーゼにより形成される局所的開状ループ構造部位とのハイブリッド形成による転写抑制、(3)合成中のRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、(4)イントロン-エキソン接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(5)スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(6)mRNAとのハイブリッド形成による、mRNAの細胞質への移行抑制、(7)キャッピング部位またはポリA付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、(8)翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、(9)リボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、(10)mRNA翻訳領域またはポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長抑制、並びに(11)核酸と蛋白質の相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制が挙げられる(平島及び井上『新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現』日本生化学会編、東京化学同人、pp.319-347 (1993))。

【0023】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸は、上述の(1)～(11)のどの機構により遺伝子発現を抑制する核酸であってもよく、即ち、発現を阻害する目的の遺伝子の翻訳領域のみならず、非翻訳領域の配列に対するアンチセンス配列を含むものであってもよい。アンチセンス核酸をコードするDNAは、その発現を可能とする適当な制御配列下に連結して使用され得る。アンチセンス核酸は、標的とする遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に対して完全に相補的である必要はなく、効果的に該遺伝子の発現を阻害するものであればよい。このようなアンチセンス核酸としては、少なくとも15bp以上、好ましくは100bp以上、さらに好ましくは500bp以上であり通常3000bp以内、好ましくは2000bp以内、より好ましくは1000bp以内の鎖長を有し、標的遺伝子の転写産物の相補鎖に対して好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上同一である。このようなアンチセンス核酸は、本発明のポリヌクレオチドを基に、ホスホロチオネート法(Stein (1988) Nucleic Acids Res. 16: 3209-21)等により調製することができる。

【0024】

リボザイムとは、RNAを構成成分とする触媒の総称であり、大きくラージリボザイム (large ribozyme) 及びスモールリボザイム (small liboyme) に分類される。ラージリボザイムは、核酸のリン酸エステル結合を切断し、反応後に5' -リン酸と3' -ヒドロキシル基を反応部位に残す酵素である。ラージリボザイムは、さらに(1)グアノシンによる5' -スプライス部位でのトランスエステル化反応を行うグループIイントロンRNA、(2)自己スプライシングをラリアット構造を経る二段階反応で行うグループIIイントロンRNA、及び(3)加水分解反応によるtRNA前駆体を5' 側で切断するリボヌクレアーゼPのRNA成分に分類される。それに対して、スモールリボザイムは、比較的小さな構造単位(40bp程度)であり、RNAを切断して、5' -ヒドロキシル基と2' -3' 環状リン酸を生じさせる。スモールリボザイムには、ハンマーヘッド型(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225)、ヘアピン型(Buzayan (1986) Nature 323: 349; Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)等のリボザイムが含まれる。リボザイムは、改変及び合成が容易になため多様な改良方法が公知であり、例えば、リボザイムの基質結合部を標的部位の近くのRNA配列と相補的となるように設計することにより、標的RNA中の塩基配列UC、UUまたはUAを認識して切断するハンマーヘッド型リボザイムを作ることができる(Koizumi et al. (1988) FEBS Lett. 228: 225; 小泉誠及び大塚栄子(1990)蛋白質核酸酵素35: 2191; Koizumi et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17: 7059)。ヘアピン型のリボザイムについても、公知の方法に従って設計、製造が可能である(Kikuchi and Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19: 6751; 菊地洋(1992)化学と生物 30: 112)。

【0025】

本発明のヌクレオチド鎖に含まれるアンチセンス核酸及びリボザイムは、細胞内における遺伝子の発現を制御するために、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス等のウイルス由来のベクター、リボソーム等を利用した非ウイルスベクター、またはnaked DNAとしてex vivo法またはin vivo法により遺伝子治療に用いることもできる。

本発明のヌクレオチド鎖の塩基配列の確認は、上述のポリヌクレオチドと同様

の方法により行うことができる。

【0026】

<ベクター>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。本発明のベクターは、本発明のポリヌクレオチドを宿主細胞内に保持したり、該ポリヌクレオチドにコードされるポリペプチドを発現させたりするのに有用である。本ベクターには、プラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、クローニング用ベクター、発現ベクター等の種々のベクターが含まれる(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989); Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987))。好ましい態様においては、ベクターを導入した宿主細胞内で本発明のポリヌクレオチドが発現されるように制御配列下に結合する。ここで「制御配列」とは、宿主細胞が原核生物であればプロモーター、リボソーム結合部位、及びターミネーターを含み、真核生物の場合は、プロモーター及びターミネーターであり、場合によってトランスアクチベーター、転写因子、転写物を安定化するポリAシグナル、スプライシング及びポリアダニル化シグナル等が含まれる。このような制御配列は、それに連結されたポリヌクレオチドの発現に必要とされるすべての構成成分を含むものである。また、本発明のベクターは、好ましくは選択可能なマーカを含む。さらに、細胞内で発現されたポリペプチドを小胞体内腔、グラム陰性菌を宿主とする場合ペリプラズム内、または細胞外へと移行させるために必要とされるシグナルペプチドを目的のポリペプチドに付加するようにして発現ベクターへ組み込むこともできる。さらに、必要に応じリンカーの付加、開始コドン(ATG)、終止コドン(TAA、TAGまたはTGA)の挿入を行ってもよい。

【0027】

本発明のベクターは、好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、in vitroでまたは、目的とする宿主細胞内で発現ベクター中にコードされるポリペプチドを発現することができる構築物を指す。クローニングベクター、バイナリーベクター、インテグレイティングベクター等が本発明の発現ベクターに含まれる。発現の過程には、発現ベクター中のコード配列の翻訳可能なmRNAへの転

写、及びmRNAから本発明のポリペプチドへの翻訳、さらに場合によっては発現されたポリペプチドの小胞体内腔、ペリプラズムまたは細胞外への分泌が含まれる。

【 0 0 2 8 】

in vitroにおけるポリペプチドの発現を可能にするベクターとしては、pBEST(Promega)を例示することができる。また、E.coli等の原核細胞宿主における発現を可能にするプロモーターとしてはP_L、araB(Better et al. (1988) Science 240: 1041-3)、lacZ(Ward et al. (1989) Nature 341: 544-6; Ward et al. (1992) FASEB J. 6: 2422-7)、trp、tac、trc(lacとtrpの融合)等のプロモーターが挙げられる。また、trpA由来、ファージ由来、rrnBリボソームRNA由来ターミネーターが、利用可能である。さらに、大腸菌用のベクターは、好ましくはベクターを宿主内で増幅するための「ori」、及び形質転換された宿主を選抜するためのマーカー遺伝子を持つ。アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、及びクロラムフェニコール等の薬剤により宿主の判別を行うことを可能にする薬剤耐性遺伝子の使用が好ましい。特に、ポリペプチドをペリプラズムへ分泌させることを目的とする場合、pelBシグナル配列(Lei et al. (1987) J. Bacteriol. 169: 4379)を使用することができる。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pCR-Script、pGEX-5X-1(Pharmacia)、pEGFP、pBluescript(Stratagene)、pET(Invitrogen;この場合の宿主はT7ポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい)等のベクターを挙げることができる。また、特にサブクローニングまたは切出し用のベクターとしては、pGEM-T、pDIRECT、pT7等を例示できる。

【 0 0 2 9 】

大腸菌以外の細菌宿主用としては、バチルス属のものが挙げられ、pUB110系、pcl94系のベクターが例示される。より具体的に、枯草菌由来のpPL608、pKTH50等を挙げることができる。その他、Pseudomonas putida、Pseudomonas cepacia等のシュードモナス属、Brevibacterium lactofermentum等のブレヴィバクテリウム属(pAJ43(Gene 39: 281 (1985))等)、Corynebacterium glutamicum等のコリネバクテリウム属(pCS11(特開昭57-183799号公報; pCB101(Mol. Gen. Genet. 196: 175 (1984))等)、ストレプトコッカス属(pHV1301(FEMS Microbiol. Lett. 26:

239 (1985))、pGK1(Appl. Environ. Microbiol. 50: 94 (1985))等)、ラクトバチルス属(pAM β 1(J. Bacteriol. 137: 614 (1979))等)、*Rhodococcus rhodochrous*等のロドコッカス属(J. Gen. Microbiol. 138: 1003 (1992))、*Streptomyces lividans*、*Streptomyces virginiae*等のストレプトマイセス属(Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual, Hopwood et al., Cold Spring Harbor Laboratories (1985)参照;pIJ486(Mol. Gen. Genet. 203: 468-78 (1986))、pKC1064(Gene 103: 97-9 (1991))、pUWL-KS(Gene 165: 149-50 (1995)))の細菌を宿主とするベクター系が開発されている。微生物を宿主として利用できるベクターについては、『微生物学基礎講座8 遺伝子工学』(共立出版)等の文献を参照することができる。ベクターを細菌宿主へ導入するための手法としては、塩化カルシウム法(Mandel and Higa (1970) J. Mol. Biol. 53: 158-62; Hanahan (1983) J. Mol. Biol. 166: 557-80)、エレクトポレーション法等を採用することができる。

【 0 0 3 0 】

また、真核細胞宿主での発現を可能にする調節要素は、酵母を宿主とする場合には、AOX1及びGAL1プロモーターが例示される。酵母由来の発現ベクターとしては、Pichia Expression Kit (Invitrogen)、pNV11、SP-Q01等が例示できる。酵母で利用可能なベクターに関しては、Adv. Biochem. Eng. 43: 75-102 (1990)、Yeast 8: 423-88 (1992)等に詳述されている。より具体的には、*Saccharomyces cerevisiae*等のサッカロマイセス属では、YRp系、YEp系、YCp系、及びYIp系ベクターが利用可能である。特に、多コピーの遺伝子導入が可能であり、安定に遺伝子を保持できるインテグレーションベクター(EP537456等)が有用である。その他、*Kluyveromyces lactis*等のクライベロマイセス属では、*S. cerevisiae*由来2 μ m系ベクター、pKD1系ベクター(J. Bacteriol. 145: 382-90 (1981))、pGK11由来ベクター、クライベロマイセス自律増殖遺伝子KARS系ベクター等、シゾサッカロマイセス属では、Mol. Cell. Biol. 6: 80 (1986)に記載のベクター、pAUR224(宝酒造)、チゴサッカロマイセスではpSB3(Nucleic Acids Res. 13: 4267 (1985))由来ベクター、*Pichia angusta*、*Pichia pastoris*等のピキア属ではYeast 7: 431-43 (1991)、Mol. Cell. Biol. 5: 3376 (1985)、Nucleic Acids Res. 15: 38

59 (1987)等の文献記載のベクター、*Candida maltosa*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. utilis*等のキャンディダ属では、特開平8-173170号公報記載のベクター、また*C. maltosa*由来のARS(Agri. Biol. Chem. 51: 1587 (1987))を利用したベクター、*Aspergillus niger*, *A. oryzae*等のアスペルギルス属では、Trends in Biotechnology 7: 283-7 (1989)記載のベクター、トリコデルマ属では菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーター(Bio/Technology 7: 596-603 (1989))を利用したベクターが利用できる。

【0031】

哺乳動物及びその他の動物細胞を宿主とする場合には、アデノウイルスlateプロモーター(Kaufman et al. (1989) Mol. Cell. Biol. 9: 946)、CAGプロモーター(Niwa et al. (1991) Gene 108: 193-200)、CMV immediate earlyプロモーター(Seed and Aruffo (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3365-9)、EF1 α プロモーター(Mizushima et al. (1990) Nucleic Acids Res. 18: 5322; Kim et al. (1990) Gene 91: 217-23)、HSV TKプロモーター、SR α プロモーター(Takebe et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8: 466)、SV40プロモーター(Mulligan et al. (1979) Nature 277: 108)、SV40 earlyプロモーター(Genetic Engineering Vol.3, Williamson ed., Academic Press (1982) pp.83-141)、SV40 lateプロモーター(Gheysen and Fiers (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 385-94)、RSV(ラウス肉腫ウイルス)-LTRプロモーター(Cullen (1987) Methods Enzymol. 152: 684-704)、MMLV-LTRプロモーター、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、及びグロビンイントロン等を使用することができる。さらに、ネオマイシン、G418等の薬剤による判別を可能とする薬剤耐性遺伝子がベクターに含まれていることが好ましい。そして、細胞内で遺伝子のコピー数の増加を計る場合には、例えば核酸合成経路を欠損したCHOを宿主とし、その欠損を補うDHFR遺伝子を有するpCHOI等のベクターを採用し、メトトレキセート(MTX)によりコピー数を増幅させることができる。一方、遺伝子の一過性発現のためには、SV40のT抗原遺伝子を染色体上に有するCOS細胞を宿主とし、pcD等のSV40の複製起点、またはアデノウイルス、ウシパピローマウイルス(BPV)、ポリオーマウイルス等の複製開始点を持つベクターを使用することができる。さらに、遺伝子コピー数の増幅のための選択

マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH)、チミジンキナーゼ (TK)、キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt)、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 等をコードする遺伝子を含んでもよい。適当なベクターとして、例えば、Okayama-Berg の発現ベクター pcDV1 (Pharmacia)、pCDM8 (Nature 329: 840-2 (1987))、pRc/CMV、pcDNA1、pcDNA3 (Invitrogen)、pSPORT1 (GIBCO BRL)、pSV2dhfr (Mol. Cell. Biol. 1: 854-64 (1981))、pEF-BOS (Nucleic Acids Res. 18: 5322 (1990))、pCEP4 (Invitrogen)、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13、pME18S (Mol. Cell. Biol. 8: 466-72 (1988)) 等が公知である。

【 0 0 3 2 】

特に動物の生体内において本発明のポリヌクレオチドを発現させるためには、pAdexlcw 等のアデノウイルスベクター、pZIPneo 等のレトロウイルスベクターが挙げられる。ベクターはアデノウイルス法、エレクトポレーション (電気穿孔) 法 (Cytotechnology 3: 133 (1990))、カチオニックリポソーム法 (カチオニックリポソーム DOTAP (Boehringer Mannheim) 等)、正電荷ポリマーによる導入法、静電気型リポソーム (electrostatic type liposome) 法、内包型リポソーム (internal type liposome) 法、パーティクルガンを用いる方法、リポソーム法、リポフェクション (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413 (1987))、リン酸カルシウム法 (特開平 2-227075)、レセプター介在遺伝子導入法、レトロウイルス法、DEAE デキストラン法、ウイルス-リポソーム法 (別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』羊土社 (1997); 別冊実験医学『遺伝子導入 & 発現解析実験法』羊土社 (1997); J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994); Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996); Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993); 実験医学 12: 1822-6 (1994); 蛋白質核酸酵素 42: 1806-13 (1997); Circulation 92 (Suppl. II): 479-82 (1995))、naked-DNA の直接導入法等により宿主に導入することができる。アデノウイルス及びレトロウイルス以外由来のウイルスベクター、例えば、アデノ随伴ウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、トガウイルス、パラミクソウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス等を元に作製されたベクターを利用することもできる。生体内への投与は、ex vivo 法でも in vivo 法で行ってもよい。

【 0 0 3 3 】

その他、昆虫発現システムも異種ポリペプチドを発現させる系として知られており、例えば、*Autographa californica*核ポリヘドロシスウイルス (AcNPV) をベクターとし、*Spodoptera frugiperda*細胞、または*Trichoplusia larvae*細胞中で外来遺伝子を発現させることができる。この際、目的とする外来遺伝子は、ウイルスの非必須領域にクローニングする。例えば、ポリヘドリンプロモーター制御下に連結してもよい。この場合、ポリヘドリン遺伝子は不活化され、コート蛋白質を欠く組換えウイルスが産生され、該ウイルスに感染した*Spodoptera frugiperda*または*Trichoplusia larvae*等の細胞中で目的とするポリペプチドが発現される (Smith (1983) J. Virol. 46: 584; Engelhard (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3224-7)。その他、昆虫細胞由来の発現ベクターとして、Bac-to-BAC baculovirus expression system (Bigco BRL)、pBacPAK8等も公知である。

【 0 0 3 4 】

植物細胞を宿主とする場合には、例えばカリフラワーモザイクウイルスの35Sプロモーター等を利用したベクターが使用可能である。植物細胞へのベクターの導入法としては、PEG法、エレクトポレーション法、アグロバクテリウム法、パーティクルガン法等が公知である。

【 0 0 3 5 】

ベクターへのDNAの挿入は、制限酵素サイトを利用したりガーゼ反応により行うことができる (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11; Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed., Cold Spring Harbor Press (1989) Section 5.61-5.63)。

【 0 0 3 6 】

<宿主>

本発明により、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主が提供される。本発明のポリペプチドの製造には、in vitro及びin vivoの産生系が考えられる。本発明の宿主には、古細菌、細菌、真菌類、植物、昆虫、魚類、両生類、ハ虫類、鳥類、哺乳類由来の原核及び真核細胞が含まれる。本発明の宿主は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に含むものである

。該ポリヌクレオチドは、宿主細胞のゲノム上の天然に存在する位置になればよく、該ポリヌクレオチド自身のプロモーター支配下にあっても、ゲノム中に組み込まれていても、染色体外の構造として保持されていても良い。

【 0 0 3 7 】

細菌宿主としては、*E. coli* (JM109, DH5 α , HB101, XL1Blue)、*Serratia marcescens*、*Bacillus subtilis*等、エシェリシア属、ストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、セラチア属、バシルス属等に属するのグラム陽性及びグラム陰性細菌を例示することができる。

【 0 0 3 8 】

真核宿主には、酵母等の真菌類、高等植物 (*Nicotiana tabacum* 由来細胞)、昆虫 (ドロソフィラ S2、スポロドプテラ Sf9、Sf21、Tn5)、魚類、両生類 (アフリカツメガエル卵母細胞 (Valle et al. (1981) *Nature* 291: 358-40))、ハ虫類、鳥類、哺乳類 (CHO (J. Exp. Med. 108: 945 (1995); 中でも DHFR 遺伝子欠損 dhfr-CHO (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216-20 (1980) 及び CHO K-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 60: 1275 (1968)) が好適である)、COS、Hela、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞)、ミエローマ、Vero、Namalwa、Namalwa KJM-1、HBT5637 (特開昭 63-299 号公報)、植物 (ジャガイモ、タバコ、トウモロコシ、イネ、アブラナ、ダイズ、トマト、コムギ、オオムギ、ライ麦、アルファルファ、亜麻等) 等の細胞が含まれる。真菌類としては、*Saccharomyces* 属に属する *Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia* 属等の酵母に加えて、糸状菌の *Aspergillus* 属の *Aspergillus niger* 等の細胞を宿主とした発現系も公知である。

【 0 0 3 9 】

宿主細胞へのベクターの導入は、エレクトポレーション法 (Chu et al. (1987) *Nucleic Acids Res.* 15: 1311-26)、カチオニックリポソーム法、電気パルス穿孔法 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 9.1-9.9)、微小ガラス管を使用した直接注入法、マイクロインジェクション法、リポフェクション (Derijard (1994) *Cell* 7: 1025-37; Lamb (1993) *Nature Genetics* 5: 22-30; Rabindran et al. (1993) *Science* 259: 230-4)、リポフェクタミン法 (GIBCO-BRL)、リン酸カルシウム法 (Chen and Okayama (1987) *Mo*

1. Cell. Biol. 7: 2745-52)、DEAEデキストラン法(Lopata et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 5707-17; Sussman and Milman (1985) Mol. Cell. Biol. 4: 1642-3)、FuGene6試薬(Boehringer-Mannheim)等により行い得る。

【0040】

<ポリペプチド断片>

本発明の「ポリペプチド断片」は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドの断片のペプチド重合体である。配列番号:1記載のアミノ酸配列を有するポリペプチドの一部と同一であり、少なくとも8アミノ酸残基以上(例えば、8、10、12、または15アミノ酸残基以上)からなるポリペプチド断片である。特に好ましい断片としては、アミノ末端、カルボキシル末端、膜貫通ドメインを欠失したポリペプチド断片を挙げることができる。 α ヘリックス及び α ヘリックス形成領域、 α 両親媒性領域、 β シート及び β シート形成領域、 β 両親媒性領域、基質結合領域、高抗原指数領域、コイル及びコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、ターン及びターン形成領域、並びに表面形成領域を含む断片が本発明のポリペプチド断片に含まれる。本発明のポリペプチド断片は、本発明のポリペプチドの抗原性さえ有すればどのような断片であってもよい。ポリペプチドの抗原決定部位は、蛋白質のアミノ酸配列上の疎水性／親水性を解析する方法(Kyte-Doolittle (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-22)、二次構造を解析する方法(Chou-Fasman (1978) Ann. Rev. Biochem 47: 251-76)により推定し、さらにコンピュータープログラム(Anal. Biochem. 151: 540-6 (1985))、または短いペプチドを合成しその抗原性を確認するPEPSCAN法(特表昭60-500684号公報)等により確認することができる。

【0041】

本発明のポリペプチド断片を構成するアミノ酸残基は天然に存在するものでも、また修飾されたものであっても良い。アミノ酸残基の修飾としては、アシル化、アセチル化、アミド化、アルギニル化、GPIアンカー形成、架橋、 γ -カルボキシル化、環化、共有架橋の形成、グリコシル化、酸化、脂質または脂肪誘導体の共有結合化、シスチンの形成、ジスルフィド結合の形成、セレノイル化、脱メチル化、蛋白質の分解処理、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合化

、ヒドロキシル化、ヒログルタメーピログルタメートの形成、フラビンの共有結合化、プレニル化、ヘム部分の共有結合化、ホスファチジルイノシトールの共有結合化、ホルミル化、ミリストイル化、メチル化、ユビキチン化、ヨウ素化、ラセミ化、ADP-リボシル化、硫酸化、リン酸化等が例示される。さらに、本発明のポリペプチドにはシグナルペプチド部分がついた前駆体、シグナルペプチド部分を欠く成熟蛋白質、及びその他のペプチド配列により修飾された融合蛋白質を含む。本発明のポリペプチドに付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、サブスタンスP、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、プロテインC断片、マルトース結合蛋白質(MBP)、免疫グロブリン定常領域、 α -チューブリン断片、 β -ガラクトシダーゼ、B-タグ、c-myc断片、E-タグ(モノクローナルファージ上のエピトープ)、FLAG(Hopp et al. (1988) Bio/Technol. 6: 1204-10)、lckタグ、p18 HIV断片、HSV-タグ(ヒト単純ヘルペスウイルス糖蛋白質)、SV40T抗原断片、T7-タグ(T7 gene10蛋白質)、VSV-GP断片(Vesicular stomatitisウイルス糖蛋白質)等の蛋白質の精製を容易にする配列(例えば、pcDNA3.1/Myc-His(Invitrogen)のようなベクターを利用できる)、組換え技術により蛋白質を生産する際に安定性を付与する配列等を選択することができる。

【0042】

本発明のポリペプチド断片は公知の遺伝子組換え技術により、また化学的な合成法により製造することができる。遺伝子組換え技術により本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片を製造する場合、製造される蛋白質は、選択する宿主の種類によってグリコシル化を受ける場合と受けない場合、さらに分子量、等電点等が異なる場合がある。通常、大腸菌等の原核細胞を宿主としてポリペプチドを発現させた場合、得られるポリペプチドは本来ポリペプチドが有していたN-末端にメチオニン残基が付加された形で産生される。このような宿主の違いにより、構造の異なるポリペプチドも本発明のポリペプチドに含まれる。

【0043】

<ポリペプチドの製造>

in vitroでポリペプチドまたはポリペプチド断片を製造する場合、in vitroト

ランスレーション(Dasso and Jackson (1989) Nucleic Acids Res. 17: 3129-44)等の方法に従って、細胞を含まない試験管内の系でポリペプチドを製造することができる。それに対して、細胞を用いてポリペプチドを製造する場合、まず、上述の中から適当な宿主細胞を選択し、目的とするDNAによる形質転換を行う。続いて形質転換された細胞を培養することにより所望のポリペプチドを得ることができる。培養は、選択した細胞に適した公知の方法により行う。例えば、動物細胞を選択した場合には、DMEM(Virology 8: 396 (1959)、MEM(Science 122: 501 (1952))、RPMI1640(J. Am. Med. Assoc. 199: 519 (1967))、199(Proc. Soc. Biol. Med. 73: 1 (1950))、IMDM等の培地を用い、必要に応じウシ胎児血清(FCS)等の血清を添加し、pH約6~8、30~40℃において15~200時間前後の培養を行うことができる。その他、必要に応じ途中で培地の交換を行ったり、通気及び攪拌を行ったりすることができる。

【0044】

一方、in vivoにおけるポリペプチドの生産系を確立するためには、動物または植物へ目的とするDNAを導入し、生体内においてポリペプチドを産生させる。ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシ等の哺乳動物、カイコ等の昆虫(Susumu (1985) Nature 315: 592-4)等の動物系が公知である(Lubon (1998) Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54)。また、哺乳動物系においてトランスジェニック動物を用いることもできる。

【0045】

例えば、所望のポリペプチドをヤギの乳汁中に分泌させることを目的とする場合、該ポリペプチドをコードするDNAを β カゼイン等の乳汁中に特異的に分泌される蛋白質をコードするDNAと結合し、目的ポリペプチドを融合蛋白質として発現させるようにする。次に、融合蛋白質をコードするDNAをヤギの胚へ導入する。DNAを導入した胚を雌ヤギの子宮へ移植する。このヤギから生まれるトランスジェニックヤギ、またはその子孫は乳汁中に所望のポリペプチドを分泌する。必要に応じ、乳汁量を増やすため、ホルモンを投与することもできる(Ebert et al. (1994) Bio/Technology 12: 699-702)。

【0046】

タバコ等の植物を用いたトランスジェニック植物のポリペプチド産生系が公知である。まず、所望のポリペプチドコードDNAをpMON530等の植物発現に適したベクターに組み込み、*Agrobacterium tumefaciens*等の細菌に導入する。DNAの導入された細菌を*Nicotina tabacum*等の植物に感染させ、植物を再生させることにより、所望のポリペプチドを得られたトランスジェニック植物の葉より単離することができる (Julian et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24: 131-8)。その他の方法としては、PEGを用いプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法 (Gene Transfer to Plants, Potrykus and Spangenberg ed. (1995) pp. 66-74; インド型イネ品種に適する)、電気パルスによりプロトプラストへDNAを導入して植物体を再生する方法 (Toki et al. (1992) *Plant Physiol.* 100: 1503-7; 日本型イネに適する)、パーティクルガン法で植物細胞に直接DNAを導入し植物体を再生する方法 (Christou et al. (1991) *Bio/Technology* 9: 957-62)、アグロバクテリウムを介し細胞にDNAを導入し植物体を再生する方法 (Hiei et al. (1994) *Plant J.* 6: 271-82) 等が確立されている。植物を再生する方法については、Toki et al. (1995) *Plant Physiol.* 100: 1503-7を参照することができる。

【0047】

トランスジェニック植物が一度得られた後は、さらに該植物の種子、果実、塊茎、塊根、株、切穂、カルス、プロトプラスト等を材料として同じように本発明のポリペプチドを産生する植物宿主を繁殖させ得ることができる。

【0048】

通常、遺伝子組換え技術により製造された本発明のポリペプチドは、まず、ポリペプチドが細胞外に分泌される場合には培地を、特にトランスジェニック生物の場合には体液等を、細胞内に産生される場合には細胞を溶解して溶解物を回収する。そして、蛋白質の精製方法として公知の塩析、蒸留、各種クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、ゲル濾過、限外濾過、再結晶、酸抽出、透析、免疫沈降、溶媒沈澱、溶媒抽出、硫酸またはエタノール沈澱等を適宜組合せることにより所望のポリペプチドを精製する。クロマトグラフィーとしては、アニオンまたはカチオン交換等のイオン交換、アフィニティー、逆相、吸着、ゲル濾過、疎水性、ヒドロキシアパタイト、ホスホセルロース、レクチンクロマトグラフィー等が公

知である(Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Marshak et al. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。HPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0049】

また、天然由来のポリペプチドを精製して取得してもよい。例えば、後述の本発明のポリペプチドに対する抗体、を利用して、アフィニティークロマトグラフィーにより精製することもできる(Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987) Section 16.1-16.19)。また、GSTとの融合蛋白質とした場合にはグルタチオンカラムを、ヒスチジンタグを付加した融合蛋白質とした場合にはニッケルカラムを用いた精製法も利用できる。本発明のポリペプチドを融合蛋白質として製造した場合には、必要に応じて精製後にトロンビンまたはファクターXa等を使用して不要な部分を切断することもできる。さらに、必要に応じてキモトリプシン、グルコシダーゼ、トリプシン、プロテインキナーゼ、リシルエンドペプチダーゼ等の酵素を用い得られたポリペプチドを修飾することも可能である。

【0050】

本発明のポリペプチド断片は、上述の合成及び遺伝子工学的な手法に加えて、ペプチダーゼのような適当な酵素を用いて本発明のポリペプチドを切断して製造することもできる。

【0051】

<抗体>

本発明により、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド断片に対する抗体が提供される。本発明の抗体にはポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体(scFV) (Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-83; The Pharmacology of Monoclonal Antibody, vol.113, Rosenberg and Moore ed., Springer Verlag (1994) pp.269-315)、ヒト化抗体、多特異性抗体(LeDoussal et al. (1992) Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62; Paulus (1985) Behring Inst. Mitt. 78: 118-32; Millstein and Cuello (1983) Nature

305: 537-9; Zimmermann (1986) Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260; Van Dijk et al. (1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)、並びに、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv等の抗体断片が含まれる。さらに、本発明の抗体は必要に応じ、PEG等により修飾されていてもよい。その他、本発明の抗体は、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合蛋白質、GST、緑色蛍光蛋白質(GFP)等との融合蛋白質として製造され得、二次抗体を用いずに検出できるようにしてもよい。また、ビオチン等により抗体を標識することによりアビジン、ストレプトアビジン等を用いて抗体の回収を行い得るように改変されていてもよい。

【0052】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド若しくはその断片、またはそれらを発現する細胞を感作抗原として製造することができる。また、本発明のポリペプチド若しくはその断片のうち短いものは、ウシ血清アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン、卵白アルブミン等のキャリアに結合して免疫原として用いてもよい。また、本発明のポリペプチドまたはその断片と共に、アルミニウムアジュバント、完全(または不完全)フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント等の公知のアジュバントを抗原に対する免疫応答を強化するために用いてもよい。

【0053】

ポリクローナル抗体は、例えば、本発明のポリペプチドまたはその断片を所望によりアジュバントと共に哺乳動物に免疫し、免疫した動物より血清を得る。ここで用いる哺乳動物は、特に限定されないが、ゲッ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が一般的である。マウス、ラット、ハムスター等のゲッ歯目、ウサギ等のウサギ目、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等のサル等の霊長目の動物が挙げられる。動物の免疫化は、感作抗原をPhosphate-Buffered Saline(PBS)または生理食塩水等で適宜希釈、懸濁し、必要に応じアジュバントを混合して乳化した後、動物の腹腔内または皮下に注射して行われる。その後、好ましくは、フロイント不完全アジュバントに混合した感作抗原を4~21日毎に数回投与する。抗体の産生は、血清中の所望の抗体レベルを慣用の方法により測定することにより確認することができる。最終的に、血清そのものをポリクローナル抗

体として用いても良いし、さらに精製して用いてもよい。具体的な方法として、例えば、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.12-11.13)を参照することができる。

【0054】

モノクローナル抗体を産生するためには、まず、上述のようにして免疫化した動物より脾臓を摘出し、該脾臓より免疫細胞を分離し、適当なミエローマ細胞とポリエチレングリコール(PEG)等を用いて融合してハイブリドーマを作成する。細胞の融合は、Milsteinの方法(Galfre and Milstein (1981) Methods Enzymol. 73: 3-46)に準じて行うことができる。ここで、適当なミエローマ細胞として特に、融合細胞を薬剤により選択することを可能にする細胞を挙げられる。このようなミエローマを用いた場合、融合されたハイブリドーマは、融合された細胞以外は死滅するヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む培養液(HAT培養液)で培養して選択する。次に、作成されたハイブリドーマの中から、本発明のポリペプチドまたはその断片に対して結合する抗体を産生するクローンを選択する。その後、選択したクローンをマウス等の腹腔内に移植し、腹水を回収してモノクローナル抗体を得る。また、具体的な方法として、『Current Protocols in Molecular Biology』(John Wiley & Sons (1987) Section 11.4-11.11)を参照することもできる。

【0055】

ハイブリドーマは、その他、最初にEBウイルスに感染させたヒトリンパ球をin vitroで免疫原を用いて感作し、感作リンパ球をヒト由来のミエローマ細胞(U266等)と融合し、ヒト抗体を産生するハイブリドーマを得る方法(特開昭63-17688号公報)によっても得ることができる。また、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物を感作して製造した抗体産生細胞を用いても、ヒト抗体を得ることができる(W092/03918; W093-02227; W094/02602; W094/25585; W096/33735; W096/34096; Mendez et al. (1997) Nat. Genet. 15: 146-56等)。ハイブリドーマを用いない例としては、抗体を産生するリンパ球等の免疫細胞に癌遺伝子を導入して不死化する方法が挙げられる。

【0056】

また、遺伝子組換え技術により抗体を製造することもできる (Borrebaeck and Larrick (1990) *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, MacMillan Publishers LTD., UK 参照)。そのためには、まず、抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマまたは抗体産生細胞 (感作リンパ球等) からクローニングする。得られた遺伝子を適当なベクターに組み込み、宿主に該ベクターを導入し、宿主を培養することにより抗体を産生させる。このような組換え型の抗体も本発明の抗体に含まれる。代表的な組換え型の抗体として、非ヒト抗体由来可変領域及びヒト抗体由来定常領域とからなるキメラ抗体、並びに非ヒト抗体由来相補性決定領域 (CDR)、及び、ヒト抗体由来フレームワーク領域 (FR) 及び定常領域とからなるヒト化抗体が挙げられる (Jones et al. (1986) *Nature* 321: 522-5; Reichmann et al. (1988) *Nature* 332: 323-9; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-6; *Methods Enzymol.* 203: 99-121 (1991))。

【0057】

本発明の抗体断片は、上述のポリクローナルまたはモノクローナル抗体をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することにより製造し得る。または、抗体断片をコードする遺伝子を用いて遺伝子工学的に製造することも可能である (Co et al. (1994) *J. Immunol.* 152: 2968-76; Better and Horwitz (1989) *Methods Enzymol.* 178: 476-96; Pluckthun and Skerra (1989) *Methods Enzymol.* 178: 497-515; Lamoyi (1986) *Methods Enzymol.* 121: 652-63; Rousseaux et al. (1986) 121: 663-9; Bird and Walker (1991) *Trends Biotechnol.* 9: 132-7 参照)。

【0058】

本発明の多特異性抗体には、二特異性抗体 (BsAb)、ダイアボディ (Db) 等が含まれる。多特異性抗体は、(1) 異なる特異性の抗体を異種二機能性リンカーにより化学的にカップリングする方法 (Paulus (1985) *Behring Inst. Mill.* 78: 118-32)、(2) 異なるモノクローナル交代を分泌するハイブリドーマを融合する方法 (Milstein and Cuello (1983) *Nature* 305: 537-9)、(3) 異なるモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子 (4種のDNA) によりマウス骨髓腫細胞等の真核細胞発現系をトランスフェクションした後、二特異性の一価部分を単離する方法 (Zimmerman (1986) *Rev. Physio. Biochem. Pharmacol.* 105: 176-260; Van Dijk et al.

(1989) Int. J. Cancer 43: 944-9)等により作製することができる。一方、Dbは遺伝子融合により構築され得る二価の2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーの抗体断片であり、公知の手法により作製することができる(Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8; EP404097; W093/11161参照)。

【0059】

抗体及び抗体断片の回収及び精製は、プロテインA及びGを用いて行う他、＜ポリペプチドの製造＞の項で詳細に記載した蛋白質精製技術によっても行い得る(Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。例えば、本発明の抗体の精製にプロテインAを利用する場合、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia)等のプロテインAカラムが公知であり、使用可能である。得られた抗体の濃度は、その吸光度を測定することにより、または酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)等により決定することができる。

【0060】

抗体の抗原結合活性は、吸光度測定、蛍光抗体法、酵素免疫測定法(EIA)、放射免疫測定法(RIA)、ELISA等により測定することができる。ELISA法により測定の場合、本発明の抗体をプレート等の担体に固相化し、次いで本発明のポリペプチドを添加した後、目的とする抗体を含む試料を添加する。ここで、抗体を含む試料としては、抗体産性細胞の培養上清、精製抗体等が考えられる。続いて、本発明の抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートのインキュベーションを行う。その後、プレートを洗浄し、二次抗体に付加された標識を検出する。即ち、二次抗体がアルカリフォスファターゼで標識されている場合には、p-ニトロフェニルリン酸等の酵素基質を添加して吸光度を測定することで、抗原結合活性を測定することができる。また、抗体の活性評価に、BIAcore(Pharmacia)等の市販の系を使用することもできる。

【0061】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチド及びその断片の精製に使用することができる。また、NMDA受容体を標的としたドラッグデリバリーシステムにおいて利

用することもできる。さらに、本発明においてmPrickle蛋白質がシナプスに局在することが確認されたことから、mPrickle蛋白質をシナプスのマーカーとして、本発明の抗体を用いた検出を行うこともできる。従って、本発明の抗体は、必要に応じシナプス検出試薬として用いることができる。

【0062】

<mPrickle遺伝子の発現領域解析>

本発明によりmPrickle遺伝子の発現制御領域が提供される。本発明の発現制御領域は、本発明のポリヌクレオチドを利用してゲノムDNAから公知の方法によってクローニングすることができる。例えば、SIマッピング法のような転写開始点の特定方法(細胞工学 別冊8 新細胞工学実験プロトコル, 東京大学医科学研究所制癌研究部編, 秀潤社(1993) pp. 362-374)が公知であり、本発明において利用できる。一般に、遺伝子の発現制御領域は、遺伝子の5'末端の15~100bp、好ましくは30~50bpをプローブDNAとして利用して、ゲノムDNAライブラリーをスクリーニングすることによりクローニングすることができる(本発明においては、配列番号: 2の塩基全部またはその1部)。このようにして得られるクローンは、10kbp以上の5'非翻訳領域を含むものであるので、次にエキソヌクレアーゼ等により処理し短縮化または断片化する。最後に、短縮された発現制御領域の候補を含む配列部分をレポーター遺伝子を利用して、その発現の有無、強さ、制御等について評価し、本発明の65B13の発現制御領域の活性維持のための最小必要単位を決定することができる。

【0063】

遺伝子の発現制御領域は、Neural Network等のプログラム(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; Reese et al., Biocomputing: Proceedings of the 1996 Pacific Symposium, Hunter and Klein ed., World Scientific Publishing Co., Singapore, (1996))を用いて予測することもできる。さらに、発現制御領域の活性最小単位を予測するプログラム(<http://biosci.cbs.umn.edu./software/proscan/promoterscan.htm>; Prestidge (1995) J. Mol. Biol. 249: 923-32)も公知であり、本発明において用いることができる。

【0064】

このようにして単離された、mPrickle遺伝子の発現領域は、in vivoでシナプス後膜肥厚特異的に所望の蛋白質を産生するのに利用することもできる。

【0065】

<リガンドの同定>

本発明により、mPrickle蛋白質に対するリガンドが提供される。mPrickle蛋白質はLIMドメイン及びPETドメインを有することから、天然におい核酸と結合する機能を有すると考えられる。そして、骨格蛋白質として知られるPSD-95と結合し、また、NMDA受容体とも関与していると予測された。従って、mPrickle蛋白質に対するアゴニストやアンタゴニスト等の機能を示す可能性があるリガンドは、学習や記憶に関与する神経細胞の形態変化、神経可塑性等の神経系の機能を制御するのに利用できる可能性がある。mPrickle蛋白質に対するリガンドの同定においては、まず、mPrickle蛋白質と候補化合物とを接触させ、結合の有無を検定する。この際、mPrickle蛋白質を担体に固定したり、細胞膜に埋めこまれた状態に発現させたりして用いることもできる。候補化合物としては特に制限はなく、遺伝子ライブラリーの発現産物、海洋生物由来の天然成分、各種細胞の抽出物、公知化合物及びペプチド、植物由来の天然成分、生体組織抽出物、微生物の培養上清、並びにファージディスプレイ法等によりランダムに製造されたペプチド群(J. Mol. Biol. 222: 301-10 (1991))等が含まれる。特に、海馬を界面活性剤により処理して得た抽出物等を候補化合物として使用すれば、生体内においてPrickle蛋白質と相互作用している物質を同定することが可能となる。さらに、結合の検出を容易にするために、候補化合物は標識しても良い。

【0066】

【実施例】

以下、実施例により本発明についてより詳細に検討するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

【実施例1】 PSD分画の調製方法

雌ラット（日本セスエルシー株式会社）の脳よりPSD分画を、Sato et al.の方法（Sato et al. (2002) "Identification of activity-regulated proteins in the postsynaptic density fraction." Genes Cells. 7: 187-97）に従っ

て調製した。

【 0 0 6 7 】

[実施例2] 難溶性分子の濃縮・同定

PSDの骨格 (scaffolding) 分子や膜蛋白質は、細胞骨格系の分子等と強く結合し、大きな複合体を形成しているために難溶性を示す。そこで、実施例1において得られたPSD画分に2%のTritonX-114(Nacalai Tesque 355-22CP)を加え、196,000×g、4℃で30分間遠心分離し可溶性画分と不溶性画分に分離した。その後、可溶化処理前のPSD画分、並びに可溶化により得られた可溶性画分及び不溶性画分に対して、NMDA受容体、PSD-95、homer1b/c(樹状蛋白質;PDZ様結合度メインを含有し、代謝型グルタミン酸誦様立位のC-末端に特異的に結合)、MAP(mitogen-activated protein)キナーゼに対する抗体(Santa cruz (C-29) SC-1467; Transduction laboratories, P43520; Santa cruz (C-16) SC-8923; Transduction laboratories, E17120)を用いてウェスタン・プロットを行った。その結果、TritonX-114不溶性画分に難溶性のPSD構成分子が濃縮していることが判明した(図1)。

【 0 0 6 8 】

[実施例3] TritonX-114不溶性画分の分離及び同定

実施例2のTritonX-114不溶性画分をさらに7M尿素と2Mチオ尿素を含む溶液で可溶化し、MonoQカラム (Amersham Pharmacia Biotech) と1D-PAGEで分離した後、銀染色及びウェスタン・プロットを行った。ウェスタンプロットには、PSD-95抗体 (Transduction laboratories, P43520) 、GluR2/3抗体 (Chemicon MAB397)、Homer 1b/c抗体 (Santa cruz (C-16) SC-8923)、アクチン抗体 (Chemicon MAB1501)、チューブリン抗体 (Chemicon MAB380)、NMDAR抗体 (Santa cruz (C-29) SC-1467)を用いた。その結果、溶出画分の17から24のフラクションにPSD-95とHomer1b/cが含まれていたため、この画分をまとめ、10%アクリルアミドゲルを用いた1D-PAGEで分離した。PAGEゲルを1~2mm幅で切出し、トリプシン消化を行った後、LCQ (classic) (Thermo Finnigan社, San Jose, CA)を使用して質量分析による同定を行った。17-24画分に含まれていた分子を表1に示す。

【表1】

種類	同定された蛋白質
骨格蛋白質	PSD-95 Homer1b SAPAP BEGAIN WAVE
膜貫通蛋白質	Densin-180 Ca channel T-Cadherin Thy-1
情報伝達蛋白質	CaM kinase II
細胞骨格蛋白質	Actin Actinin Tubulin Spectrin Cortactin binding protein 1 Nerofilament-H, -M, -L Neurabin 1, 2
シナプス前膜蛋白質	Rim
その他	Ribosomal protein
不明	EST clone (MS733)

【0069】

[実施例4] MS733のホモロジーサーチ

実施例3において同定された機能が未知のESTクローン(MS733) (IMAGE consortium) をプローブとして、対応する全長配列をクローニングした。MS733全長配列についての塩基配列を決定し(配列番号:2)、データベースサーチ(GenBank; blast search)を行った。

【0070】

その結果、MS733は、D-Prickleと約23%の相同性を示した。そこで、本MS733蛋白質をラットprickle(R-Prickle)と命名した。D-PrickleとR-Prickleのアミノ酸配列レベルを比較した結果を図2に示す。また、D-Prickleのアミノ酸配列を配列番号:3、R-Prickleのアミノ酸配列を配列番号:1に示す。本発明のR-Prickleは

847アミノ酸残基からなり、N末端に1つのPETドメイン、及び3つのLIMドメインを有している(図2及び3)。このような構造は、Prickleファミリー間で良く保存されていた(図3)。

【0071】

[実施例5] R-Prickleの組織分布

ラットの各組織のホモジェネート(20 μ g蛋白質)に対し、SDS-PAGE後、抗Prickle抗体を用いたウエスタンブロットを行った。

まず、雌ラット(日本セスエルシー株式会社)をジエチルエーテルで麻酔し、PBS緩衝液を用い環流を行った。その後、各臓器を取出し、約10倍量のPBS緩衝液を加え、テフロン(登録商標)ホモジナイザーでホモジェナイズした。ホモジェネートを800 \times g、10分間遠心し、上清を各組織のホモジェネートとして使用した。

次に、mPrickleのアミノ酸365-618残基の部分 GST融合蛋白質として発現させ、ウサギ抗血清を作成し、アフィニティー精製を行い抗Prickle抗体としてウエスタンブロットに用いた。詳細な抗体の作成手順は、Ohtsukaらの方法(Ohtsuka et al. (2002) "Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc 13-1." J. Cell Biol. 158: 577-90)に従って行った。その結果、脳において2本のバンドが認められた(図4)。長時間感光させた場合、骨格筋にもシグナルが認められた。このことから、R-Prickleは脳に強く発現していることが示唆された。

【0072】

[実施例6] R-Prickleびラット脳における細胞内分布

Subcellular分画(10 μ g蛋白質)をSDS-PAGEした後、抗R-Prickle抗体を用いてウエスタンブロットを行った。subcellular分画の調製は、Ohtsukaらの方法(Ohtsuka et al. (2002) "Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc 13-1." J. Cell Biol. 158: 577-90)に従って行った。その結果、R-PrickleはNMDA受容体と同様にPSD分画に強く濃縮していた(図5)。

【0073】

[実施例7] R-Prickleの可溶化

次に、両性(1%CHAPS(NacalaiTesque))、非イオン性(1%NP40(NacalaiTesque))、1%Triton-X100(NacalaiTesque))、及びイオン性(1%SDS(NacalaiTesque))、1%DOC(NacalaiTesque))の界面活性剤を用いてR-Prickleの可溶化を行った。R-Prickleの調製は、Ohtsukaらの方法 (Ohtsuka et al. (2002) "Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc 13-1." J.Cell Biol. 158: 577-90) に従って行った。その結果、R-Prickleは、CHAPS、NP-40及びTritonX-100ではほとんど可溶化されなかったのに対し、DOCで一部可溶化され、SDSではほぼ完全に可溶化された(図6)。従って、R-Prickleはシナプス結合の細胞骨格に強く結合していることが示唆された。

【 0 0 7 4 】

[実施例8] R-Prickleの各発生段階における発現

R-Prickleのラット胎児E18から出生後P70までの発生段階におけるラット大脳のホモジネートをSDS-PAGEした。

ラット(日本セスエルシー株式会社)からの大脳ホモジネートの調製は、実施例5記載の方法に従って行った。その後、抗R-Prickle抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、R-Prickleは、P14で発現がピークに達することが判った(図7)。

【 0 0 7 5 】

[実施例9] 初代培養神経細胞におけるR-Prickleの局在

抗R-Prickle抗体を用いて、ラット胎児海馬初代培養におけるR-Prickleの局在を検討した。培養28日目の細胞を固定し、シナプス前膜のマーカであるシナプトフィジン、active zoneのマーカであるBassoon、シナプス後膜のマーカであるPSD-95との共染色を行った (Ohtsuka et al. (2002) "Cast: a novel protein of the cytomatrix at the active zone of synapses that forms a ternary complex with RIM1 and munc 13-1." J.Cell Biol. 158: 577-90) (図8)。R-Prickleとこれらのマーカの局在はほぼ一致し、特にPSD-95とよく一致していたことから、R-Prickleは、シナプス後膜に局在することが示唆された。

【0076】

【発明の効果】

本発明により、従来MSSとして知られていたPSD画分に存在する蛋白質をコードする遺伝子、mPrickle遺伝子が提供された。mPrickle蛋白質は、本発明においてシナプスに局在することが確認され、シナプスのマーカーとして使用することができる。また、骨格蛋白質として知られるPSD-95と結合することが示され、PSD-95の精製に利用することもできる。さらに、mPrickleに対する抗体を用いてmPrickleを生体内より沈澱させるとNMDA受容体も一緒に沈澱されることから、NMDA受容体を標的としたドラッグデリバリーシステムにおいてmPrickleを利用することができる。さらに、NMDA受容体は、学習及び記憶と密接に関連し、精神疾患との関係も指摘されている。従って、NMDA受容体との関与が明らかにされたmPrickle蛋白質または遺伝子を用いシナプスにおけるその発現・機能を検討することは、記憶、学習、神経の発達段階を知る上でも、また、神経変性疾患の機序を研究する上でも重要と思われる。そして、将来的には、mPrickleを利用したボケ、痴呆等の学習・記憶に関連した疾患の診断や治療も可能と考えられる。

【0077】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Eisai Co., Ltd.

<120> mammalian Prickle genes

<130> E1-A0207

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 847

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 1

Met Val Thr Val Met Pro Leu Glu Met Glu Lys Thr Ile Ser Lys Leu
1 5 10 15

Met Phe Asp Phe Gln Arg Asn Ser Thr Ser Asp Asp Asp Ser Gly Cys
20 25 30

Ala Leu Glu Glu Tyr Ala Trp Val Pro Pro Gly Leu Lys Pro Glu Gln
35 40 45

Val His Gln Tyr Tyr Ser Cys Leu Pro Glu Glu Lys Val Pro Tyr Val
50 55 60

Asn Ser Pro Gly Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gln Leu Leu His Gln Leu
65 70 75 80

Pro Pro His Asp Asn Glu Val Arg Tyr Cys Asn Ser Leu Asp Glu Glu
85 90 95

Glu Lys Arg Glu Leu Lys Leu Phe Ser Asn Gln Arg Lys Arg Glu Asn
100 105 110

Leu Gly Arg Gly Asn Val Arg Pro Phe Pro Val Thr Met Thr Gly Ala
115 120 125

Ile Cys Glu Gln Cys Gly Gly Gln Ile Lys Gly Gly Asp Ile Ala Val
130 135 140

Phe Ala Ser Arg Ala Gly His Gly Ile Cys Trp His Pro Pro Cys Phe
145 150 155 160

Ile Cys Thr Val Cys Asn Glu Leu Leu Val Asp Leu Ile Tyr Phe Tyr
165 170 175

Gln Asp Gly Lys Ile Tyr Cys Gly Arg His His Ala Glu Cys Leu Lys
180 185 190

Pro Arg Cys Ala Ala Cys Asp Glu Ile Ile Phe Ala Asp Glu Cys Thr
195 200 205

Glu Ala Glu Gly Arg His Trp His Met Arg His Phe Cys Cys Phe Glu
210 215 220

Cys Glu Thr Val Leu Gly Gly Gln Arg Tyr Ile Met Lys Glu Gly Arg
225 230 235 240

Pro Tyr Cys Cys His Cys Phe Glu Ser Leu Tyr Ala Glu Tyr Cys Asp
245 250 255

Thr Cys Ala Gln His Ile Gly Ile Asp Gln Gly Gln Met Thr Tyr Asp

260

265

270

Gly Gln His Trp His Ala Thr Glu Asn Cys Phe Cys Cys Ala His Cys

275

280

285

Lys Lys Ser Leu Leu Gly Arg Pro Phe Leu Pro Lys Gln Gly Gln Ile

290

295

300

Phe Cys Ser Arg Ala Cys Ser Ala Gly Glu Asp Pro Asn Gly Ser Asp

305

310

315

320

Ser Ser Asp Ser Ala Phe Gln Asn Ala Arg Ala Lys Glu Ser Arg Arg

325

330

335

Ser Ala Lys Ile Gly Lys Asn Lys Gly Lys Thr Glu Glu Thr Met Leu

340

345

350

Asn Gln His Ser Gln Leu Gln Val Ser Ser Asn Arg Leu Ser Ala Asp

355

360

365

Val Asp Pro Leu Ser Val Gln Met Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ser Gln

370

375

380

Thr Pro Ser Leu Asn Arg Asp Pro Ile Trp Arg Ser Arg Asp Glu Pro

385

390

395

400

Phe His Tyr Gly Asn Lys Met Glu Gln Asn Gln Ser Gln Ser Pro Leu

405

410

415

Gln Leu Leu Ser Gln Cys Asn Ile Arg Thr Ser Tyr Ser Pro Gly Gly
420 425 430

Gln Ala Ala Gly Ala Gln Pro Asp Met Trp Ala Lys His Phe Ser Asn
435 440 445

Pro Lys Arg Ser Ser Ser Met Ala Leu Lys Gly His Gly Gly Ser Phe
450 455 460

Ile Gln Glu Cys Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Gly Arg Leu Met Ser Gln
465 470 475 480

Glu Ser Tyr Ser Asp Met Ser Ser Gln Ser Phe Ser Glu Thr Arg Gly
485 490 495

Ser Ile Pro Val Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
500 505 510

Glu Gly Gly Ile Ser Thr Gln Gln Cys Arg Pro Arg Arg Pro Leu Ser
515 520 525

Ser Leu Lys Tyr Thr Glu Asp Met Thr Pro Thr Glu Gln Thr Pro Arg
530 535 540

Gly Ser Met Glu Ser Leu Ala Leu Ser Asn Ala Thr Gly Leu Ser Ala
545 550 555 560

Glu Gly Gly Ala Lys Arg Gln Glu His Leu Ser Arg Phe Ser Met Pro
565 570 575

Asp Leu Ser Lys Asp Ser Gly Met Asn Val Ser Glu Lys Leu Ser Asn
580 585 590

Met Gly Thr Leu Asn Ser Ser Met Gln Phe Arg Ser Ala Glu Ser Val
595 600 605

Arg Ser Leu Leu Ser Ala Gln Gln Tyr Gln Glu Met Glu Gly Asn Leu
610 615 620

His Gln Leu Ser Asn Pro Leu Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ser His Gly
625 630 635 640

Arg Met His Gln Ser Phe Asp Phe Asp Gly Gly Ile Ala Ser Ser Lys
645 650 655

Leu Pro Gly Gln Glu Gly Val His Ile Gln Pro Met Ser Glu Arg Thr
660 665 670

Arg Arg Arg Thr Thr Ser Arg Asp Asp Asn Arg Arg Phe Arg Pro His
675 680 685

Arg Ser Arg Arg Ser Arg Arg Ser Arg Ser Asp Asn Ala Leu His Leu
690 695 700

Ala Ser Glu Arg Glu Val Ile Ala Arg Leu Lys Asp Arg Pro Pro Leu
705 710 715 720

Arg Ala Arg Glu Asp Tyr Asp Gln Phe Val Arg Gln Arg Ser Phe Gln

725

730

735

Glu Ser Met Gly Gln Gly Ser Arg Arg Asp Leu Tyr Ser Gln Cys Pro
740 745 750

Arg Thr Val Ser Asp Leu Ala Leu Gln Asn Ala Phe Gly Glu Arg Trp
755 760 765

Gly Pro Tyr Phe Thr Glu Tyr Asp Trp Cys Ser Thr Cys Ser Ser Ser
770 775 780

Ser Glu Ser Asp Asn Glu Gly Tyr Phe Leu Gly Glu Pro Ile Pro Gln
785 790 795 800

Pro Ala Arg Leu Arg Tyr Val Thr Ser Asp Glu Leu Leu His Lys Tyr
805 810 815

Ser Ser Tyr Gly Val Pro Lys Ser Ser Thr Leu Gly Gly Arg Gly Gln
820 825 830

Leu His Ser Arg Lys Arg Gln Lys Ser Lys Asn Cys Ile Ile Ser
835 840 845

<210> 2

<211> 3385

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (403).. (2943)

<400> 2

gaattcggca cgaggttttag aggagaaggg ttcttgagaa gacaattcca ggactcaggc 60

aggcctagaa caagggcaca agtcgcactc tctggcttgg tggatctcta gcagggtctg 120

ctttcagggga gggcgttctc tcggagggaa tgcaaaagaa gaccggtttg ggtttgagcc 180

tgctgcctgc ctccggaagg gctcagattc gcagagactc tgtaaaggag atgtttgggc 240

tgcttgggggt cctgcttgca ttttctggta ccagctccag ggggaaagtg aactggggca 300

actgaccaga tcaagactcg gtggcggctt cttctaaagc ttcgcggctc atcctctagg 360

aggaagatct gcctgcactg caagtgtccc caggaggagc ac atg gtg aca gtg 414

Met Val Thr Val

1

atg ccg ctg gag atg gag aag acc att agc aag ctc atg ttt gac ttc 462

Met Pro Leu Glu Met Glu Lys Thr Ile Ser Lys Leu Met Phe Asp Phe

5

10

15

20

cag agg aat tca acc tca gat gac gac tcg ggc tgt gct ttg gaa gaa 510

Gln Arg Asn Ser Thr Ser Asp Asp Asp Ser Gly Cys Ala Leu Glu Glu

25

30

35

tat gcc tgg gtc ccc ccg ggg ctg aag cct gag cag gtg cac cag tat 558
 Tyr Ala Trp Val Pro Pro Gly Leu Lys Pro Glu Gln Val His Gln Tyr
 40 45 50

tat agc tgc ctc cca gaa gag aaa gtt ccc tat gtc aac agc cct gga 606
 Tyr Ser Cys Leu Pro Glu Glu Lys Val Pro Tyr Val Asn Ser Pro Gly
 55 60 65

gag aaa ttg cga atc aag cag cta ctg cac cag ctg cca ccc cac gac 654
 Glu Lys Leu Arg Ile Lys Gln Leu Leu His Gln Leu Pro Pro His Asp
 70 75 80

aat gag gtt cgg tat tgc aac tcc ctg gac gag gag gag aag cgg gag 702
 Asn Glu Val Arg Tyr Cys Asn Ser Leu Asp Glu Glu Glu Lys Arg Glu
 85 90 95 100

ctg aag ctg ttc agc aac cag agg aaa cgt gag aac ctg ggc cga ggc 750
 Leu Lys Leu Phe Ser Asn Gln Arg Lys Arg Glu Asn Leu Gly Arg Gly
 105 110 115

aat gtc agg ccc ttc ccc gtc acc atg aca ggg gct att tgc gaa cag 798
 Asn Val Arg Pro Phe Pro Val Thr Met Thr Gly Ala Ile Cys Glu Gln
 120 125 130

tgt gga ggt cag att aag ggc ggc gac atc gct gtg ttt gca tca cgt 846
 Cys Gly Gly Gln Ile Lys Gly Gly Asp Ile Ala Val Phe Ala Ser Arg
 135 140 145

gct ggc cat ggc atc tgc tgg cat cca cca tgc ttt ata tgc aca gtc 894
 Ala Gly His Gly Ile Cys Trp His Pro Pro Cys Phe Ile Cys Thr Val
 150 155 160

tgc aat gag ctt ctg gtt gac ctg atc tac ttt tac caa gat ggg aag 942
 Cys Asn Glu Leu Leu Val Asp Leu Ile Tyr Phe Tyr Gln Asp Gly Lys
 165 170 175 180

atc tac tgt ggc agg cac cat gct gag tgc ctg aag ccg cgc tgt gca 990
 Ile Tyr Cys Gly Arg His His Ala Glu Cys Leu Lys Pro Arg Cys Ala
 185 190 195

gcc tgt gat gag atc atc ttt gca gat gag tgc aca gag gct gaa gga 1038
 Ala Cys Asp Glu Ile Ile Phe Ala Asp Glu Cys Thr Glu Ala Glu Gly
 200 205 210

cga cat tgg cac atg aga cac ttc tgc tgc ttc gag tgt gag acg gtg 1086
 Arg His Trp His Met Arg His Phe Cys Cys Phe Glu Cys Glu Thr Val
 215 220 225

ctg ggg ggc cag cgc tac atc atg aag gag gga aga ccc tac tgc tgt 1134
 Leu Gly Gly Gln Arg Tyr Ile Met Lys Glu Gly Arg Pro Tyr Cys Cys
 230 235 240

cac tgc ttt gag tcc ctg tat gca gaa tat tgt gac acc tgt gcc caa 1182
 His Cys Phe Glu Ser Leu Tyr Ala Glu Tyr Cys Asp Thr Cys Ala Gln
 245 250 255 260

cat ata gga att gac caa ggt caa atg acc tat gac ggc caa cac tgg 1230

His Ile Gly Ile Asp Gln Gly Gln Met Thr Tyr Asp Gly Gln His Trp
 265 270 275

cat gct acg gag aac tgt ttc tgc tgt gct cat tgt aag aag tct ctc 1278
 His Ala Thr Glu Asn Cys Phe Cys Cys Ala His Cys Lys Lys Ser Leu
 280 285 290

ctg ggg cgg cca ttc ctc ccg aag caa ggc cag ata ttc tgc tca cgg 1326
 Leu Gly Arg Pro Phe Leu Pro Lys Gln Gly Gln Ile Phe Cys Ser Arg
 295 300 305

gcc tgt agt gct ggg gag gac ccc aat ggc tct gac tca tct gat tca 1374
 Ala Cys Ser Ala Gly Glu Asp Pro Asn Gly Ser Asp Ser Ser Asp Ser
 310 315 320

gcc ttc cag aat gcc aga gcc aag gag tct cgc cgc agt gcc aaa att 1422
 Ala Phe Gln Asn Ala Arg Ala Lys Glu Ser Arg Arg Ser Ala Lys Ile
 325 330 335 340

ggc aag aac aag ggc aaa aca gag gaa acc atg ctg aac cag cac agc 1470
 Gly Lys Asn Lys Gly Lys Thr Glu Glu Thr Met Leu Asn Gln His Ser
 345 350 355

cag ctg cag gtg agt tct aac cgg ctc tca gct gat gtg gac ccc ctg 1518
 Gln Leu Gln Val Ser Ser Asn Arg Leu Ser Ala Asp Val Asp Pro Leu
 360 365 370

tca gtg cag atg gat ctc ctc agc ctg tcc agc cag acg ccc agc ctc 1566
 Ser Val Gln Met Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ser Gln Thr Pro Ser Leu

375	380	385	
aac cgg gac ccc att tgg agg agc cgg gat gag ccc ttc cat tac ggg 1614			
Asn Arg Asp Pro Ile Trp Arg Ser Arg Asp Glu Pro Phe His Tyr Gly			
390	395	400	
aac aag atg gag cag aac caa tcc cag agt cct ttg cag ctc ctc agc 1662			
Asn Lys Met Glu Gln Asn Gln Ser Gln Ser Pro Leu Gln Leu Leu Ser			
405	410	415	420
cag tgc aac atc aga acg tcc tac agt cca gga ggg cag gca gca gga 1710			
Gln Cys Asn Ile Arg Thr Ser Tyr Ser Pro Gly Gly Gln Ala Ala Gly			
	425	430	435
gcc cag cct gac atg tgg gcc aag cac ttc agc aac ccc aag aga agc 1758			
Ala Gln Pro Asp Met Trp Ala Lys His Phe Ser Asn Pro Lys Arg Ser			
440	445	450	
tca tca atg gcc ctg aag ggg cac ggt ggc agt ttt atc cag gaa tgt 1806			
Ser Ser Met Ala Leu Lys Gly His Gly Gly Ser Phe Ile Gln Glu Cys			
455	460	465	
cgt gag gac tat tac cca ggg agg ctg atg tcc cag gag agc tac agc 1854			
Arg Glu Asp Tyr Tyr Pro Gly Arg Leu Met Ser Gln Glu Ser Tyr Ser			
470	475	480	
gat atg tct agc caa agc ttt agt gaa acc cga ggc agc atc ccg gtt 1902			
Asp Met Ser Ser Gln Ser Phe Ser Glu Thr Arg Gly Ser Ile Pro Val			
485	490	495	500

ccc aag tat gag gag gag gag gag gag gag gag gaa gaa ggt ggc ata 1950
 Pro Lys Tyr Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Gly Gly Ile
 505 510 515

tct acc cag cag tgc cgg ccc cgg cgt cca ctc agc tcc ctg aaa tac 1998
 Ser Thr Gln Gln Cys Arg Pro Arg Arg Pro Leu Ser Ser Leu Lys Tyr
 520 525 530

aca gag gac atg aca ccc aca gaa cag act cct cgt ggc tct atg gaa 2046
 Thr Glu Asp Met Thr Pro Thr Glu Gln Thr Pro Arg Gly Ser Met Glu
 535 540 545

tca ctg gcc ctg tca aat gca aca ggc ctg tct gct gaa ggt ggt gcc 2094
 Ser Leu Ala Leu Ser Asn Ala Thr Gly Leu Ser Ala Glu Gly Gly Ala
 550 555 560

aag cgc cag gag cac cta tcc cgg ttt tcc atg cct gac ctc agc aaa 2142
 Lys Arg Gln Glu His Leu Ser Arg Phe Ser Met Pro Asp Leu Ser Lys
 565 570 575 580

gac tct gga atg aat gtc tcg gaa aag ctg agc aac atg ggc act ctc 2190
 Asp Ser Gly Met Asn Val Ser Glu Lys Leu Ser Asn Met Gly Thr Leu
 585 590 595

aac tcc tca atg caa ttc agg agc gca gag tct gtc cgc agc cta ctg 2238
 Asn Ser Ser Met Gln Phe Arg Ser Ala Glu Ser Val Arg Ser Leu Leu
 600 605 610

tct gcg caa cag tac cag gag atg gag gga aac ctt cac cag ctc agc 2286
Ser Ala Gln Gln Tyr Gln Glu Met Glu Gly Asn Leu His Gln Leu Ser
615 620 625

aac ccc ctg ggg tac agg gac cta cag tcc cat gga agg atg cac cag 2334
Asn Pro Leu Gly Tyr Arg Asp Leu Gln Ser His Gly Arg Met His Gln
630 635 640

agc ttt gat ttt gat ggc ggc ata gcg agc agc aag cta cca ggg cag 2382
Ser Phe Asp Phe Asp Gly Gly Ile Ala Ser Ser Lys Leu Pro Gly Gln
645 650 655 660

gaa ggt gtt cac atc cag ccc atg agt gag cgc acc cgg agg aga act 2430
Glu Gly Val His Ile Gln Pro Met Ser Glu Arg Thr Arg Arg Arg Thr
665 670 675

act tcc agg gat gac aac cgc cgc ttc cgc cct cac cgg tcc agg agg 2478
Thr Ser Arg Asp Asp Asn Arg Arg Phe Arg Pro His Arg Ser Arg Arg
680 685 690

tcc cga cgc tca cgt tca gac aac gcc ctg cac cta gcc agc gag cgg 2526
Ser Arg Arg Ser Arg Ser Asp Asn Ala Leu His Leu Ala Ser Glu Arg
695 700 705

gaa gtc atc gct cgg ttg aag gat agg ccc cct ctg aga gcc agg gag 2574
Glu Val Ile Ala Arg Leu Lys Asp Arg Pro Pro Leu Arg Ala Arg Glu
710 715 720

gac tat gac cag ttc gtg cgc caa cgc agt ttt cag gag agc atg ggg 2622

Asp Tyr Asp Gln Phe Val Arg Gln Arg Ser Phe Gln Glu Ser Met Gly
 725 730 735 740

cag ggt tcc cgg cgg gat ctg tac agc cag tgt ccc agg act gtg tca 2670
 Gln Gly Ser Arg Arg Asp Leu Tyr Ser Gln Cys Pro Arg Thr Val Ser
 745 750 755

gac ctg gct ttg cag aat gcc ttt ggg gaa cga tgg gga ccc tac ttc 2718
 Asp Leu Ala Leu Gln Asn Ala Phe Gly Glu Arg Trp Gly Pro Tyr Phe
 760 765 770

acg gag tat gat tgg tgc tcc acc tgc tcc tcc tct tca gag tcc gac 2766
 Thr Glu Tyr Asp Trp Cys Ser Thr Cys Ser Ser Ser Ser Glu Ser Asp
 775 780 785

aat gag ggc tac ttc cta gga gaa ccc atc ccc cag cca gcc cgc cta 2814
 Asn Glu Gly Tyr Phe Leu Gly Glu Pro Ile Pro Gln Pro Ala Arg Leu
 790 795 800

cga tat gtc aca agt gat gag ctc ctg cac aag tac agc tct tac ggt 2862
 Arg Tyr Val Thr Ser Asp Glu Leu Leu His Lys Tyr Ser Ser Tyr Gly
 805 810 815 820

gtc ccc aaa tcc tcc acc tta ggt ggc aga gga cag ttg cac agc agg 2910
 Val Pro Lys Ser Ser Thr Leu Gly Gly Arg Gly Gln Leu His Ser Arg
 825 830 835

aaa aga cag aag agc aaa aac tgt atc att tcg taatgtgatg gtgggtgggg 2963
 Lys Arg Gln Lys Ser Lys Asn Cys Ile Ile Ser

840

845

aatcggggag atgggagcta agaatgtaaa ctcagaaacg tgcactgttg tgaattctca 3023

agtgtctttg gggatgggtc atggaggaga gatggagaat gctctcagtt gagggaggca 3083

aggctgcagg ttgacttggt agatacactt ggtgtcacag tttgggacgt gttaaataatg 3143

atttgcacat ttcacttttg aaacacaggc tgtggaggcc agggtaggtc atgtcctttc 3203

caaggtggag tggccattaa ccagatgaca cactgtaacc tgctcactta tattctttct 3263

ggttctcttc cttttaggat cccttttcca gtaaatactt tattagccag gaccccagac 3323

taagttatit acatgttcat tgtaaataca atgtaaata gagttctgat aaaatatit 3383

tg

3385

<210> 3

<211> 963

<212> PRT

<213> *Drosophila melanogaster*

<400> 3

Met Asp Thr Pro Asn Gln Met Pro Val Glu Leu Glu Arg Pro Ile Ser

1

5

10

15

Arg Thr Pro Leu Thr Gln Ile Ser Tyr Leu Gln Lys Ile Pro Thr Leu

20

25

30

Pro Arg His Phe Ser Pro Ser Gly Gln Gly Leu Ala Thr Pro Pro Ala

35

40

45

Leu Gly Ser Gly Gly Met Gly Leu Pro Ser Ser Ser Ser Ala Ser Ala

50

55

60

Leu Tyr Ala Ala Gln Ala Ala Ala Gly Ile Leu Pro Thr Ser Pro Leu

65

70

75

80

Pro Leu Gln Arg His Gln Gln Tyr Leu Pro Pro His His Gln Gln His

85

90

95

Pro Gly Ala Gly Met Gly Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ala Ala Ala Gly

100

105

110

Pro Pro Leu Gly Pro Gln Tyr Ser Pro Gly Cys Ser Ala Asn Pro Lys

115

120

125

Tyr Ser Asn Ala Gln Leu Pro Pro Pro Pro His His His His Gln Leu

130

135

140

Ser Pro Ala Leu Ser Thr Pro Ser Pro Pro Ser Leu Leu His His Pro

145

150

155

160

Ala Gly Gly Thr Ser Ser Ala Ser Ala His Ala Pro Phe Leu Gly Gly

165

170

175

Pro His Met Asp Met Gln Arg Gln Ser His Ser Asp Asp Asp Ser Gly
180 185 190

Cys Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Trp Val Pro Pro Gly Leu Arg Pro Asp
195 200 205

Gln Val Arg Leu Tyr Phe Ser Gln Ile Pro Asp Asp Lys Val Pro Tyr
210 215 220

Val Asn Ser Pro Gly Glu Gln Tyr Arg Val Arg Gln Leu Leu His Gln
225 230 235 240

Leu Pro Pro His Asp Asn Glu Val Arg Tyr Cys His Ser Leu Thr Asp
245 250 255

Glu Glu Arg Lys Glu Leu Arg Leu Phe Ser Thr Gln Arg Lys Arg Asp
260 265 270

Ala Leu Gly Arg Gly Asn Val Arg Gln Leu Met Ser Ala Arg Pro Cys
275 280 285

Asp Gly Cys Asp Asp Leu Ile Ser Thr Gly Asp Ile Ala Val Phe Ala
290 295 300

Thr Arg Leu Gly Pro Asn Ala Ser Trp His Pro Ala Cys Phe Ala Cys
305 310 315 320

Ser Val Cys Arg Glu Leu Leu Val Asp Leu Ile Tyr Phe His Arg Asp
325 330 335

Gly Arg Met Tyr Cys Gly Arg His His Ala Glu Thr Leu Lys Pro Arg
340 345 350

Cys Ser Ala Cys Asp Glu Ile Ile Leu Ala Asp Glu Cys Thr Glu Ala
355 360 365

Glu Gly Arg Ala Trp His Met Asn His Phe Gly Cys His Glu Cys Asp
370 375 380

Lys Gln Leu Gly Gly Gln Arg Tyr Ile Met Arg Glu Gly Lys Pro Tyr
385 390 395 400

Cys Leu His Cys Phe Asp Ala Met Phe Gly Glu Tyr Cys Asp Tyr Cys
405 410 415

Gly Glu Gly Ile Gly Val Asp Gln Gly Gln Met Ser His Asp Gly Gln
420 425 430

His Trp His Ala Thr Asp Glu Cys Phe Ser Cys Asn Thr Cys Arg Cys
435 440 445

Ser Leu Leu Gly Arg Ala Phe Leu Pro Arg Arg Gly Gly Ile Tyr Cys
450 455 460

Ser Ile Ala Cys Ser Lys Gly Glu Pro Pro Thr Pro Ser Asp Ser Ser
465 470 475 480

Gly Thr Gly Met Tyr Thr Thr Pro Thr Pro Pro Thr Gln Gly Val Arg

485

490

495

Pro His Pro Gln Ala Pro Leu Pro Ala Arg Ile Pro Ser Ser His Ala
500 505 510

Ser Ser Ser Pro Pro Met Ser Pro Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Ala
515 520 525

Thr Phe Asn Gln Ala Met Tyr Gln Met Gln Ser Gln Gln Met Glu Ala
530 535 540

Ala Gly Gly Leu Val Asp Gln Ser Lys Ser Tyr Ala Ala Ser Asp Ser
545 550 555 560

Asp Ala Gly Val Val Lys Asp Leu Glu His Gly Gly His Met Gly Gly
565 570 575

Gly Asp Leu Thr Asp Phe Ser Gly Gly Arg Ala Ser Ser Thr Ser Gln
580 585 590

Asn Leu Ser Pro Leu Asn Ser Pro Gly Asp Phe Gln Pro His Phe Leu
595 600 605

Pro Lys Pro Met Glu Leu Gln Arg Asp Gly Val Tyr Asn Phe Asn Glu
610 615 620

Met Ser Ser Asn Leu Asp Ala Ala Trp Pro Ala Lys Pro Thr Asn Ser
625 630 635 640

Tyr His Leu Gln Arg Gln Leu Leu Glu Asn Pro His Thr Ala Ser Met
645 650 655

Pro Glu Leu Ala Gly Lys Leu Val Ala Pro Pro Ala His Met Gln His
660 665 670

Leu Ser Gln Leu His Ala Val Ser Ser His Gln Phe Gln Gln His Glu
675 680 685

Tyr Ala Asp Ile Val His Pro Pro Pro Pro Pro Gly Glu Ile Pro
690 695 700

Glu Leu Pro Thr Pro Asn Leu Ser Val Ala Ser Thr Ala Leu Pro Pro
705 710 715 720

Glu Leu Met Gly Ser Pro Thr His Ser Ala Gly Asp Arg Ser Leu Asn
725 730 735

Thr Pro Met Ser Thr Gln Ser Ala Ser His Ala Pro Pro His Pro Val
740 745 750

Ser Ile Leu Ser Gly Ala Ser Ser Ser Ser Pro Met Ser Gly Glu Pro
755 760 765

Ala Lys Lys Lys Gly Val Arg Phe Glu Gly Ile Pro Asp Thr Leu Pro
770 775 780

Arg Ser Arg Ser Tyr Ser Gly Asn Gly Ala Gly Thr Ser Ser Gly Gly
785 790 795 800

Glu Arg Glu Arg Asp Arg Asp Lys Asp Lys Glu Gly Gly Gly Arg His
805 810 815

Gly His Gly His Ser Ser Arg Arg Arg Arg Arg Arg Lys Ser Ser Ser
820 825 830

Ser Ser Ser His His Arg Ser Gly Ser Gly His Arg Ser His Ser Thr
835 840 845

Thr Arg Ala Asp Thr Tyr Ala Pro Ala Gln Pro Leu Ser Ser Ser Tyr
850 855 860

Gln Gly Pro Pro Ser Val Leu Gln Ala Ala Asn Leu Val His Glu Ser
865 870 875 880

Pro Ser Arg Gln Gln Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Glu Arg Lys Glu
885 890 895

Ser Glu Glu Ser Asp Val Cys Ser Thr Cys Ser Ser Ser Ser Ser Ser
900 905 910

Ser Glu Asp Tyr Met Met Met Tyr Gln Leu Pro Gln Arg Arg His Tyr
915 920 925

Gly Gly Val Arg Val Ser Tyr Val Pro Asn Asp Ala Leu Ala Tyr Asp
930 935 940

Arg Lys Arg Lys Pro Ser Glu Leu Gly Gly Asp Lys Asp Lys Asn Cys

945

950

955

960

Ile Ile Ser

【図面の簡単な説明】

【図 1】 可溶化前の分画、並びに可溶化後の上清及び沈澱に対してNMDAR、PSD-95、homer1b/c及びMAPK抗体を用いてウェスタン・ブロットを行った結果を示す写真である。

【図 2】 本発明のR-Prickleのアミノ酸配列とD-Prickleのアミノ酸配列レベルでの比較。

【図 3】 Prickleファミリー間でのドメイン構造を比較する模式図である。斜線部はPETドメインを、黒塗りの部分はLIMドメインを、点の部分は質量分析により同定した領域を示す。Hs:ヒト、XP:アフリカツメガエル、D:ショウジョウバエ、Ci:カタユウレイボヤ。

【図 4】 R-Prickleのラットの各組織における組織分布を示す写真である。

【図 5】 R-Prickleのラット脳における細胞内分布を示す写真である。H:ホモジネート、SPM:シナプス原形質膜、PSD-S1:0.5%TritonX-100可溶性SPM、PSD-P1: 0.5%TritonX-100不溶性SPM、PSD-S2: 1%TritonX-100可溶性SPM、PSD-P2: 1%TritonX-100不溶性SPM。

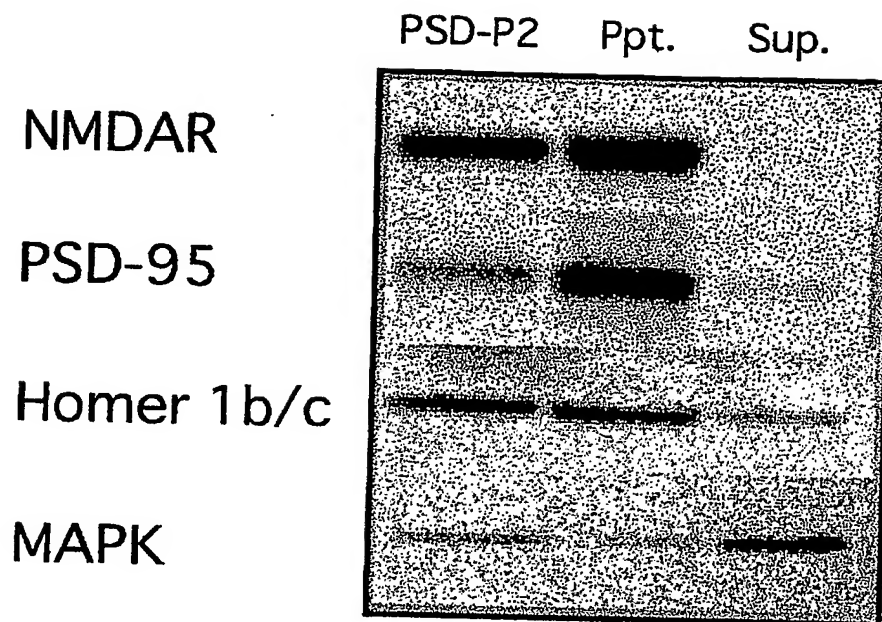
【図 6】 各種界面活性剤によるR-Prickleの可溶化を調べた結果を示す写真である。P:ペレット、S:上清、Triton:TritonX-100、DOC:デオキシコール酸ナトリウム。

【図 7】 R-Prickleの各発生段階におけるラット大脳における発現を示す写真である。

【図 8】 ラット胎児海馬初代培養におけるR-Prickleの局在を示す写真である。

【書類名】 図面

【図1】



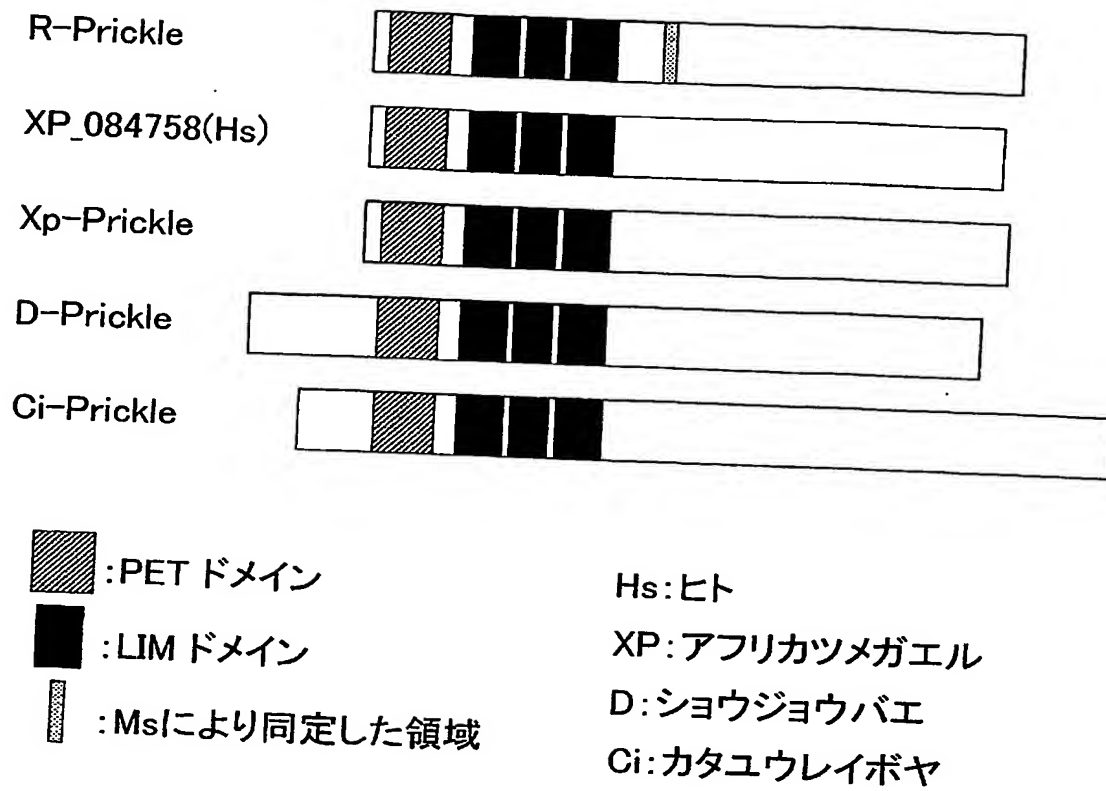
【図 2】

R-Prickle	1	MVTV--MPLE	MEKTI	SK---	-----	-----	-----	-----	-----
D-Prickle	1	MDTTPNQMPVE	LERPI	SRTPL	TQI SYLQKI P	TLPRHFSPSG	QGLATPPALG	-----	-----
R-Prickle	51	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D-Prickle	51	SGGMGLPSSS	SASALYAAQA	AAGI LPT SPL	PLQRHQYLP	PHHQHPGAG	-----	-----	-----
R-Prickle	101	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
D-Prickle	101	MGP GPGSGAA	AGPPLGPQYS	PGCSANPKYS	NAQLPPPHH	HHQLSPALST	-----	-----	-----
R-Prickle	151	-----LM-----	-----	-----FD	FORNSTSDD	SGCALEEYAW	-----	-----	-----
D-Prickle	151	PSPPSLLHHP	AGGTSSASAH	APFLGGPHMD	MORQSHSDD	SGCALEEYTW	-----	-----	-----
R-Prickle	201	VPPGLKPEOV	HQYYSCLPEE	KVPYVNSPGE	KLRI KOLLHQ	LPPHDNEVRY	-----	-----	-----
D-Prickle	201	VPPGLRFDQV	RLYFSQIPDD	KVPYVNSPGE	QYVRQLLHQ	LPPHDNEVRY	-----	-----	-----
R-Prickle	251	CNSLDEEEKR	ELKLF SNORK	REN LG RGNVR	PFPVTMTGAI	CEQCGGQIKG	-----	-----	-----
D-Prickle	251	CHSLTDEERK	ELRLFSTORK	RDALGRGNVR	QL---MSARP	CDGCDLST	-----	-----	-----
R-Prickle	301	GDI AVFASRA	GHGI CWHPPC	FI CTVCNELL	VDLI YFYQDG	KI YCGRHAE	-----	-----	-----
D-Prickle	301	GDI AVFATRL	GNASWHPAC	FACSVCRELL	VDLI YFHRDG	RM YCGRHAE	-----	-----	-----
R-Prickle	351	CLKPRCAACD	EII FADECTE	AEGRHWHMRH	FCFCETVL	GGORYI MKEG	-----	-----	-----
D-Prickle	351	TLKPRCSACD	EII LADECTE	AEGRAWHMNH	FGCHECDKQL	GGORYI MREG	-----	-----	-----
R-Prickle	401	RPYCCHCFES	LYAEYCDTCA	QHI GIDQGOM	TYDGOHWAT	ENCFCAHCK	-----	-----	-----
D-Prickle	401	KPYCLHCFDA	MFG EYCDYCG	EGI GVDQGOM	SHDGOHWAT	DECFSCNTR	-----	-----	-----
R-Prickle	451	KSL LGRPFLP	KQQQIFCSRA	CSAGEDPNGS	DSSDSAF---	-----QNARA	-----	-----	-----
D-Prickle	451	CSLLGRAFLP	RRGGIYCSIA	CSKGEPPTPS	DSSGTGMYTT	PTPPTQGVPR	-----	-----	-----
R-Prickle	501	K-ESRRSAKI	GKNKGKTEET	MLNCHSOLQV	SSNRLSADVD	PLSVQMDLLS	-----	-----	-----
D-Prickle	501	HPQAPLPARI	PSSHASSP	MSPQQQQH-	-----QATFN	QAMYQMGSQQ	-----	-----	-----
R-Prickle	551	LSSQTPSLNR	DPI WRSRDEP	FHYGNKMEQN	QSQSPLQLLS	QCNI RTSYSP	-----	-----	-----
D-Prickle	551	MEAAGGLVDQ	SKSYAASDSD	AGVVKDLEHG	GHMGGGDLTD	FSGGRASSTS	-----	-----	-----
R-Prickle	601	GGQAAGAQP	MWAKHFSNPK	RSSSMALKGH	GGFSI QECRE	DYYPGRMSQ	-----	-----	-----
D-Prickle	601	QNL SPLNSPG	DFQPHFLPK	-----PMELQ--	-----RD	GVY-----	-----	-----	-----
R-Prickle	651	ESYSDMSSQS	FSETRGSI PV	PKYEEEE---	EEEEGGI ST	QQCRPRRPLS	-----	-----	-----
D-Prickle	651	-NFNEMSSN-	LDAAWPAKPT	NSYHLQRQLL	ENPHTASMPE	LAGKLVAPPA	-----	-----	-----
R-Prickle	701	SLKYTEDMTP	TEQTPRGSM	SLALS NATGL	SAEGGAKRQE	HLSRFSMPDL	-----	-----	-----
D-Prickle	701	HMQLHSQLHA	VSSHQFQQHE	YADI VHPP--	-----PPPPG	EI PELPTPNL	-----	-----	-----
R-Prickle	751	SKDSGMNVSE	KLSNMGT LNS	SMQFRSAESV	RSLLSAQQYQ	EMEGNLHQLS	-----	-----	-----
D-Prickle	751	SVASTALPPE	LMGSPTHSAG	DRSLNTPMST	QSASHAPPHP	-----VSI LS	-----	-----	-----
R-Prickle	801	NPLGYRDLQS	HGRMHQS FDF	DC---GI ASS	KLPQGEQVHI	QPMSETRRRR	-----	-----	-----
D-Prickle	801	GASSSSPMMSG	EPAKKKGVRF	EQI PDTLPRS	RSYSGNAGT	SSGGERERDR	-----	-----	-----
R-Prickle	851	TTSRDDN-RR	FRPHRSRRSR	RSRSDNALHL	ASEREVI ARL	KDRPPLRARE	-----	-----	-----
D-Prickle	851	DKDKEGGGRH	GHGHSSRRRR	RRKSSSS---	SSHHRSGSGH	RSHSTTRA-D	-----	-----	-----
R-Prickle	901	DYDQFVR-QR	SFOESMGQS	RRDLYSQCP-	RTVSDLALQN	AFGERWGPYF	-----	-----	-----
D-Prickle	901	TYAPAQLSS	SYQGPPSVLQ	AANLVHESPS	RQQRERERER	---ERKES--	-----	-----	-----
R-Prickle	951	TEYDWCSTCS	SSSESDNEGY	FLGEPI POP-	-----ARLRYV	TSDLLHKYS	-----	-----	-----
D-Prickle	951	EESDVCSTCS	SSS-SSSEY	MMMYQLPORR	HYGGVRVSYV	PNDAL-----	-----	-----	-----
R-Prickle	1001	SYGV-PKSST	LGGRGQLHSR	KRQKSKNCII	S	-----	-----	-----	-----
D-Prickle	1001	AYDRKRKPSE	LGG-----	--DKDKNCII	S	-----	-----	-----	-----

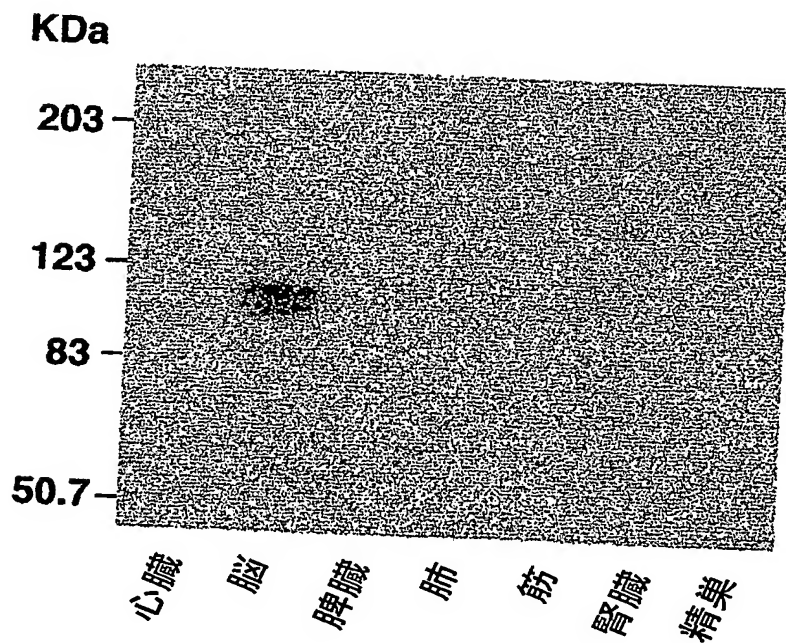
PETドメイン

LIMドメイン

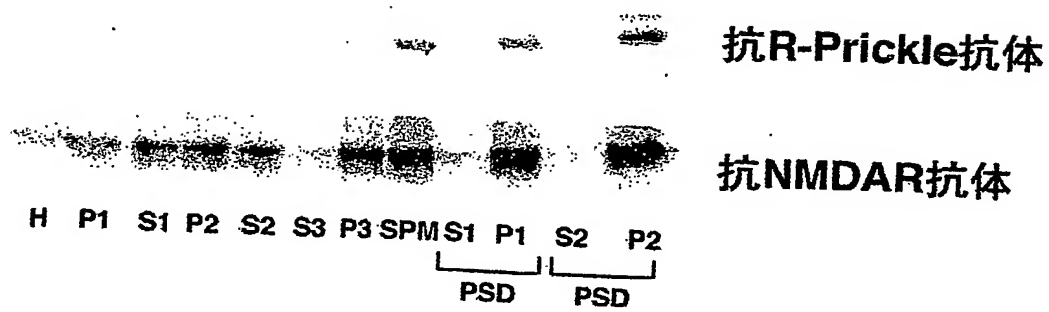
【図 3】



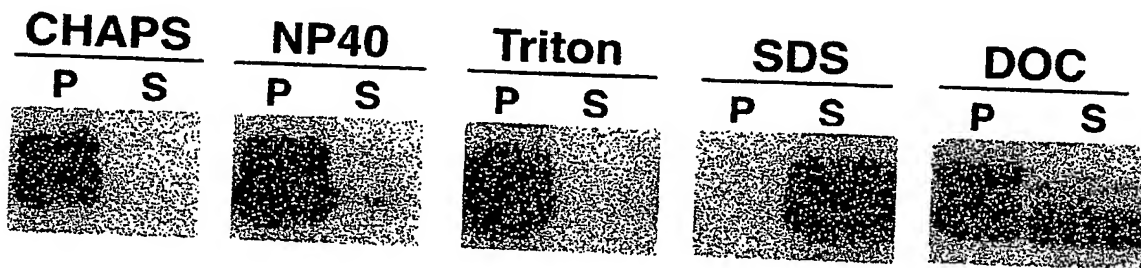
【図 4】



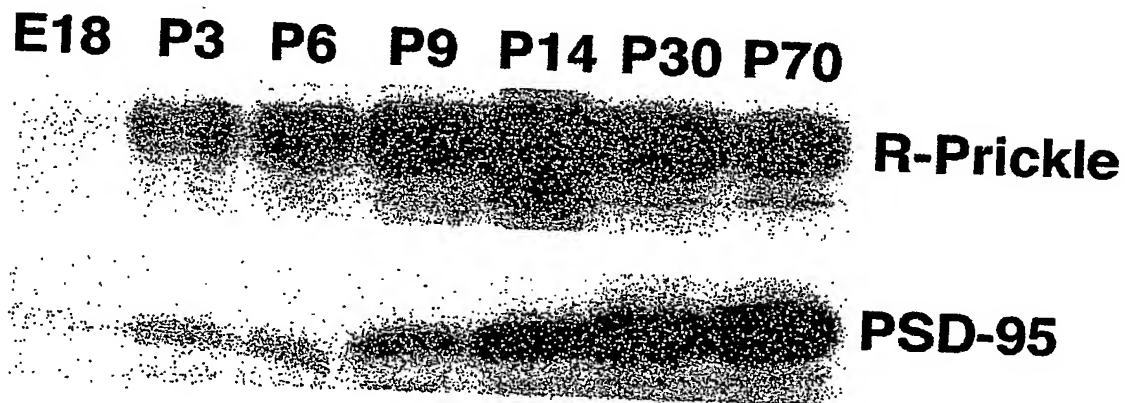
【図5】



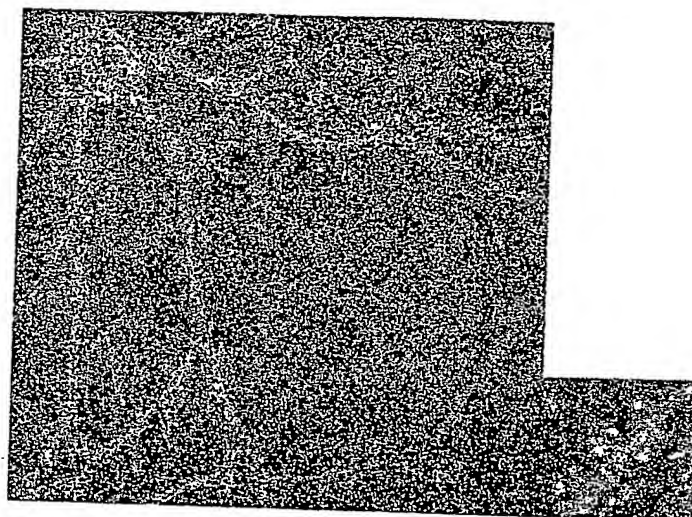
【図6】



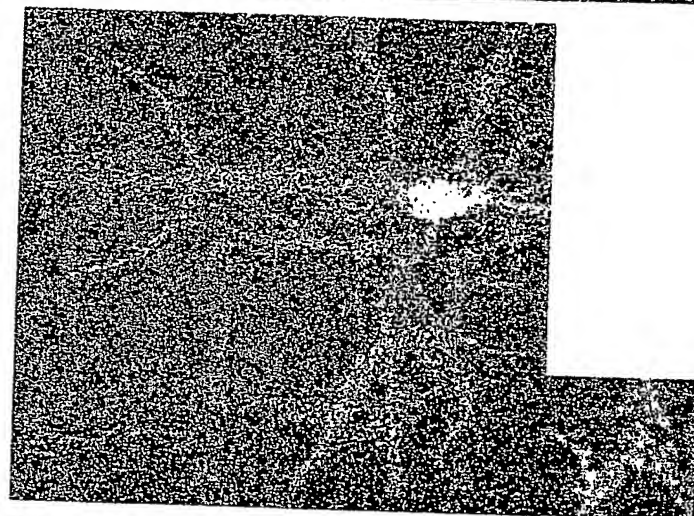
【図7】



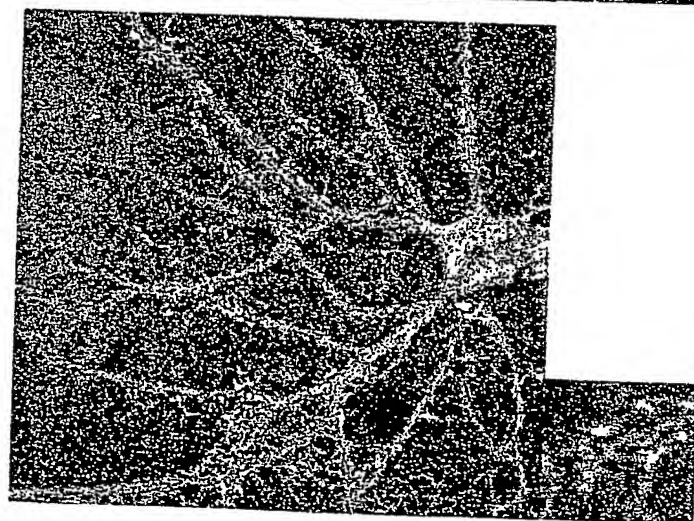
【図 8】



R-Prickle:GFP
PSD-95:FITC



R-Prickle:GFP
Bassoon:FITC



R-Prickle:GFP
シナプソフィジン:FITC

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明の目的はシナプスに局在する、神経伝達に関与する新規遺伝子を提供することである。

【解決手段】 本発明により哺乳動物のPSD画分に存在する蛋白質をコードするmPrickle遺伝子が提供される。mPrickle蛋白質は、シナプスに局在し、骨格蛋白質PSD-95と結合する。また、抗mPrickle抗体を用いてmPrickleを生体内より沈澱させるとNMDA受容体も一緒に沈澱されることから、NMDA受容体を標的としたドラッグデリバリーシステムにおいてmPrickleを利用することができる。NMDA受容体は学習及び記憶と密接に関連し、精神疾患との関係も指摘されていることから、将来的には、mPrickleを利用したボケ、痴呆等の学習・記憶に関連した神経変性疾患の診断・治療も可能と考えられる。

【選択図】 なし

特願 2002-346447

出願人履歴情報

識別番号

[000000217]

1. 変更年月日
[変更理由]

住所
氏名

1990年 8月29日

新規登録

東京都文京区小石川4丁目6番10号
エーザイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.